



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Funktionelle Analyse des *Hox* Gens *Ultrabithorax*
während der Etablierung neuromuskulärer Netzwerke
in *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität,

Mainz

vorgelegt von

Christian Hessinger

geboren am 22.11.1985 in Mainz

Mainz, Juli 2016

*In summary, there are no small problems.
Problems that appear small are large problems
that are not understood.*

Advice for the young investigator
Santiago Ramón y Cajal

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE EMBRYONALE NEUROGENESE VON <i>D. MELANOGASTER</i>	1
1.2 DER EINFLUSS DER <i>Hox</i> -GENE AUF DIE NEUROGENESE	5
1.3 DIE ENTWICKLUNG DES NEUROMUSKULÄREN SYSTEMS	9
1.4 ZIELE DIESER ARBEIT	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIAL UND VERSUCHSTIERE	13
2.1.1 Geräte	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3 Versuchstiere und Modellorganismen	20
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	22
2.2.1 DNA-Isolation aus Gewebe	22
2.2.2 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	23
2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren	24
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion	24
2.2.5 Standardklonierung	27
2.2.6 Restriktionsfreie-Klonierung	31
2.2.7 Gateway-Klonierung	33
2.2.8 Sondenherstellung	34
2.3 ZELLKULTUR	35
2.3.1 Transfektion von S2R+ Zellen	36
2.4 BIMOLEKULARER-FLUORESZENTER-KOMPLEMENTATIONSTEST (BiFC)	37
2.5 FLIEGENARBEIT	38
2.5.1 Fliegenhaltung	38
2.5.2 Kreuzungen	39
2.5.3 Balancer Chromosomen	39
2.5.4 Ektopische Genexpression mit dem UAS/Gal4-System	40
2.5.5 RNA-Interferenz	41
2.5.6 Einzelzellmarkierung mittels Flybow	41
2.5.7 Erstellung transgener Fliegenlinien mit dem Φ C31-System	43
2.5.8 Ein modularer Modifier Screen zur Identifikation von Ubx-Interaktionspartnern	44
2.6 IMMUNOHISTOCHEMIE	45
2.6.1 Gewinnung von Embryonen	45
2.6.2 Chemische Dechorionisierung von Embryonen	46
2.6.3 Chemische Fixierung	46
2.6.4 mRNA in situ Hybridisierung	48
2.6.5 Fluoreszente Antikörperfärbungen	52
2.7 ANFERTIGUNG MIKROSKOPISCHER PRÄPARATE	53
2.8 DOKUMENTATION DER FÄRBUNGEN	54
3 ERGEBNISSE	55
3.1 IDENTIFIKATION POTENTIELLER UBX PROTEIN-INTERAKTIONSPARTNER	55
3.1.1 Der genetische Modifier-Screen in Fliegenaugen	56
3.1.2 in situ Expressionsanalysen potentieller Interaktionspartner von Ubx	58
3.1.3 Visualisierung von Ubx-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen mit der Bimolekularen-Fluoreszenten-Komplementation (BiFC)	60
3.1.4 Zusammenfassung	63
3.2 DER EINFLUSS VON UBX AUF DIE KORREKTE INNERVATION DER VENTRO-LATERALEN MUSKELGRUPPE	63
3.2.1 Morphologische Charakterisierung des neuromuskulären Systems in den Segmenten T1-A1	64
3.2.2 Ubx ist nötig für die korrekte Innervation der ventro-lateralen Muskeln unabhängig von abdA	68
3.2.3 Ubx interagiert mit dem Wnt4- und dem NetrinB-Signalweg auf genetischer Ebene	76
3.2.4 Der kanonische Wnt4-Signalweg ist in RP-Neuronen aktiv	83

3.2.5 <i>Ubx</i> , <i>arm</i> und <i>fra</i> sind zellautonom in RP5 und RP3 für die korrekte Innervation von VL1 und VL3/4 nötig	86
3.2.6 <i>Ubx</i> ist nötig und ausreichend für die Expression von Wegfindungsfaktoren in ventrolateralen Muskeln	88
3.2.7 Gewebsspezifische Rettungsversuche in der <i>Ubx</i> ¹ -Mutante bestätigen eine duale Rolle von <i>Ubx</i> während der Etablierung neuro-motorischer Netzwerke	92
3.2.8 Zusammenfassung	96
3.3 CHARAKTERISIERUNG DES GW-NEURONS IM HINBLICK AUF DIE <i>UBX</i> VERMITTELTE APOPTOSE	96
3.3.1 Morphologische Charakterisierung der GW-Projektion mittels <i>Flybow</i>	97
3.3.2 Markerexpressionsanalysen für neurosekretorische Zellen und Motoneurone	101
3.3.3 Charakterisierung der GW-Projektion nach Reduktion von <i>Ubx</i>	104
3.3.4 Zusammenfassung	107
4 DISKUSSION	108
4.1 PROTEIN-INTERAKTIONEN ALS EINE MÖGLICHKEIT HOX-FUNKTIONEN ZU SPEZIFIZIEREN	108
4.2 <i>UBX</i> HAT EINE DUALE ROLLE WÄHREND DER ENTWICKLUNG DES VENTRALEN NEUROMUSKULÄREN SYSTEMS	109
4.3 WIE STEUERT WNT4 DIE SYNAPTOGENESE?	111
4.4 TRANSKRIPTIONELLE EINFLÜSSE WÄHREND DER AXONALEN WEGFINDUNG UND DER SYNAPTOGENESE	114
4.5 HOX-VERMITTELTE APOPTOSE WÄHREND DER AUSBILDUNG NEURONALER NETZWERKE	117
5 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	119
5.1 ZUSAMMENFASSUNG	119
5.2 SUMMARY	120
6 LITERATURVERZEICHNIS	121
7 ANHANG	134
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
7.1.1 Allgemeine Abkürzungen	134
7.1.2 Abkürzungen für Gene	138
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	139
7.3 TABELLENVERZEICHNIS	140
7.4 PLASMIDKARTEN UND SEQUENZEN	141
7.4.1 Generierte <i>BiFC-Destination-Vektoren</i>	141
7.4.2 <i>Entry-Vektoren</i>	157
7.4.3 <i>pMT Gal4_UASmCherry</i>	172
7.5 CURRICULUM VITAE	176
7.6 PUBLIKATIONSLEISTUNG	176
7.7 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	178
7.8 DANKSAGUNG	179

1 Einleitung

Eine wichtige Fragestellung der Neuroentwicklungsgenetik ist, wie die morphologische und funktionale Zelldiversität des Nervensystems während der Entwicklung zustande kommt und wie diese entlang der Anterior/Posterioren-Körperachse (A/P-Achse) spezifiziert wird. Unterschiedliche Körperabschnitte übernehmen Regionen-spezifische Aufgaben, wie beispielsweise die Sinneswahrnehmung, die Lokomotion, die Respiration oder die Reproduktion und das neuronale Netzwerk muss sich entsprechend seiner Funktion ausbilden. Diese Spezifizierung stellt eine Herausforderung in allen bilateralen Organismen dar. Seit Beginn der Evolution des Nervensystems haben sich die grundlegenden molekularen und genetischen Prinzipien der es aufbauenden Zellen nicht grundlegend verändert. Dieser Tatsache ist es zu verdanken, dass die Untersuchung von Entwicklungsprozessen in einem relativ einfachen Modellorganismus wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) weitreichende Aufschlüsse auch über die Entwicklung des menschlichen Nervensystems geben kann (Arendt and Nübler-Jung, 1999). *D. melanogaster* eignet sich aufgrund ihrer über 100-jährigen Laborgeschichte und der in dieser Zeit entwickelten vielfältigen zellbiologischen, physiologischen, genetischen und molekulargenetischen Methoden hervorragend als Untersuchungsobjekt neuronaler Entwicklungsprozesse.

1.1 Die embryonale Neurogenese von *D. melanogaster*

Morphogengradienten führen zu einer grundlegenden Orientierung im Embryo und aktivieren abhängig von ihrer Konzentration kaskadenartig weitere Gruppen von Genen (Schnorrer and Dickson, 2004; Wolpert, 1989). Bereits in der Eizelle von *D. melanogaster* finden sich Genprodukt-Gradienten Maternaler Effektgene, die nach der Befruchtung in der Zygote aktiv werden (Riechmann and Ephrussi, 2001). Von den Maternalen Effektgenen werden die Lückengene, von denen die Paarregelgene und schließlich die Homöotischen Gene und die Segmentpolaritätsgene aktiviert. Die Aktivität dieser Gengruppen führt zur Regionalisierung und Segmentierung des Embryos (Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Auch die Entwicklung des Nervensystems wird von diesen Prozessen beeinflusst, indem neurale Vorläuferzellen von den genannten Genklassen spezifiziert werden (Bhat, 1999; Deshpande et al., 2001; Technau et al., 2006; Urbach and Technau, 2003b).

Im Gastrula-Stadium können bereits distinkte Bereiche des bilateralen Neuroectoderms ausgemacht werden, die sich ventral im entwickelnden Embryo befinden und aus welchen sich das Zentrale Nervensystem (ZNS) entwickelt. Diese neurogene Zone unterteilt sich in das anterior gelegene procephale Neuroektoderm, aus welchem sich das Gehirn bildet, und das weiter posterior gelegene ventrale Neuroektoderm, welches das Suboesophagialganglion und das ventral gelegene Bauchmark hervorbringt (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Das ventrale Bauchmark stellt das homologe Pendant zum Rückenmark in Vertebraten dar (Arendt and Nübler-Jung, 1999). Es setzt sich aus vierzehn Ganglienpaaren zusammen, welche longitudinal durch Nervenbündel, den sogenannten Konnektiven, und horizontal durch Kommissuren strickleiterartig miteinander verbunden sind. Dabei existieren drei gnathale (C1-C3), drei thorakale (T1-T3) und acht abdominale (A1-A8) segmentale Ganglien.

Innerhalb des Neuroektoderms werden die neuralen Vorläufer eines jeden Hemisegments entlang der A/P-Achse und der Dorso/Ventralen-Achse (D/V-Achse) wie in einem kartesischen Koordinatensystem durch Wirkung der Segmentpolaritätsgene (beispielsweise *wingless (wg)*, *gooseberry (gsb)* oder *engrailed (en)*) und der dorsoventralen Musterbildungsgenen (*ventral nervous system defective (vnd)*, *intermediate Neuroblast defective (ind)* und *muscle segment homeobox (msh)*) spezifiziert (**Abbildung 1**) (Technau et al., 2014).

Ausgangspunkt aller Zellen des ZNS sind neurale Stammzellen, welche in *D. melanogaster* Neuroblasten (NBs) genannt werden (Wheeler, 1891) und in den letzten zwanzig Jahren intensiv untersucht wurden. Nach der Bildung des Neuroektoderms werden diese in jedem Segment definiert. Das Neuroektoderm besteht aus einer einzelnen Schicht äquipotenter Zellen. Die NBs gehen aus proneuralen Clustern innerhalb des Neuroektoderms hervor, welche durch die Expression proneuraler Gene des *Achaete-scute (As-c)*-Komplexes gekennzeichnet sind (Skeath and Carroll, 1992; Skeath and Carroll, 1994). Alle Zellen des Clusters werden zu einer neuralen Äquivalenzgruppe gezählt und besitzen das gleiche Potential, neurale oder epidermale Zellen zu bilden (Technau et al., 2006). Durch den Mechanismus der lateralen Inhibition, bei welcher mittels des Notch-Delta-Signalwegs proneurale Gene in benachbarten Zellen inhibiert werden, wird nur eine Zelle eines proneuralen Clusters definiert neurale Gene zu exprimieren und damit ein neurales Schicksal anzunehmen (**Abbildung 1**) (Egger et al., 2008).

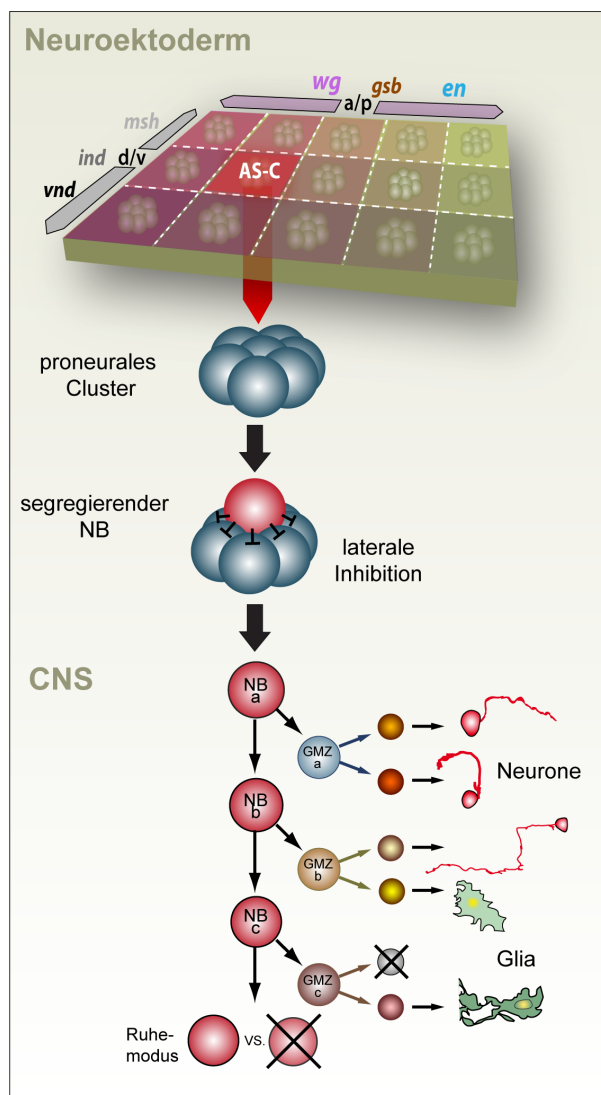


Abbildung 1: Entstehung des embryonalen Nervensystems in *D. melanogaster*.

In den neurogenen Regionen, welche das Neuroektoderm bilden, erhalten die Zellen durch Aktivität der Segmentpolaritätsgene (zum Beispiel *wg*, *gsb* und *en*) und die dorso-ventralen Musterbildungsgene (*vnd*, *ind* und *msh*) entlang der anterior/posterioren (a/p) beziehungsweise entlang der dorso/ventralen (d/v) Achse Positionsinformationen innerhalb eines jeden Hemisegments (HS). Durch die Aktivität des Achaete-Scute-Komplex (AS-C) werden proneurale Cluster innerhalb des Neuroektoderms gebildet. Mittels lateraler Inhibition wird innerhalb eines Clusters eine Zelle selektiert einen NB zu bilden. Dieser hemmt das neurale Schicksal in den umliegenden Zellen. Der NB teilt sich im Verlauf der weiteren Neurogenese im Stammzellmodus um zunächst Gangliemutterzellen (GMZs) zu bilden, aus denen Neurone und/oder Gliazellen entstehen. Innerhalb dieser Zelllinien werden einzelne Zellen durch programmierten Zelltod entfernt (Kreuz). Am Ende der embryonalen Neurogenese geht der NB entweder in einen Ruhezustand über oder wird durch programmierten Zelltod entfernt. Abbildungselemente mit freundlicher Genehmigung von Christof Rickert.

Die NBs delaminieren im frühen Embryonalstadium 9 bis zum späten Stadium 11 positionsspezifisch in fünf aufeinander folgenden Segregationswellen (S1-S5) ins Innere des Embryos, um dort durch asymmetrische Zellteilung im Stammzellmodus sogenannte Gangliemutterzellen (GMZ) zu bilden (Zhong and Chia, 2008). GMZs sind kleiner als NBs und teilen sich in der Regel nur noch einmal in postmitotische Neurone und/oder Gliazellen (**Abbildung 1**) (Hartenstein et al., 1987). Es sind jedoch zwei Ausnahmen von neuronalen Vorläuferzellen bekannt, welche sich nicht wie NBs asymmetrisch und selbstregenerierend teilen: zum einen Gliale Vorläuferzellen, welche in jedem Hemisegment der neurogenen Zone des Bauchmarks longitudinale Gliazellen produzieren (Jacobs et al., 1989), und zum anderen eine dem Mesektoderm entstammende Mittellinienvorläuferzelle (MP2), welche die beiden Neurone dorsal MP2

(dMP2) und ventral MP2 (vMP2) produziert (Bossing et al., 1996; Doe et al., 1988; Egger et al., 2008).

Jeder NB kann anhand seiner Position und genetischen Marker exakt identifiziert werden (Doe, 1992). Am Ende der Embryogenese besteht das Ventrale Nervensystem (VNS) aus ca. 350 Neuronen und etwa 30 Gliazellen pro Hemineuromer, die aus circa 30 NBs hervorgegangen sind (Schmidt et al., 1997). Einige NBs gehen in eine Ruhephase über, um erst während der Larvalentwicklung wieder aktiv zu werden und dort das adulte ZNS auszubilden. Die übrigen NBs degenerieren durch programmierten Zelltod (**Abbildung 1**) (Prokop and Technau, 1991; Rogulja-Ortmann et al., 2007).

Ein Modell, anhand dessen die Neuroblastenspezifizierung untersucht werden kann, stellt der NB7-3 dar. Dieser eignet sich aufgrund der überschaubaren Anzahl an Nachkommenzellen insbesondere zur Untersuchung des programmierten Zelltods während der neuronalen Entwicklung (Karcavich and Doe, 2005; Lundell, 2003; Rogulja-Ortmann et al., 2008). Der NB7-3 wird im posterioren Bereich des Hemisegments (Reihe 7) generiert und exprimiert dementsprechend in allen Segmenten En. Weiterhin exprimiert der NB7-3 und alle seine Nachkommen den Transkriptionsfaktor Eagle (Eg) (Dittrich et al., 1997; Higashijima et al., 1996). Der Zellstammbaum besteht in T1 und T2 aus drei bis vier sogenannten EW-Interneuronen und einem sogenannten efferenten GW-Neuron, während in T3-A7 lediglich drei Interneurone (EW1-3) am Ende der Embryogenese ausgemacht werden können (Geyer et al., 2015; Rogulja-Ortmann et al., 2008). Die Interneurone sind durch die Expression des Neurotransmitters Serotonin (EW1 und EW2), sowie die Expression des Neuropeptids Corazonin (Crz in EW3) gekennzeichnet (Karcavich and Doe, 2005; Lundell and Hirsh, 1998; Novotny et al., 2002). EW1 und GW können anhand der Expression des Transkriptionsfaktors Hb von den restlichen Eg-positiven Neuronen des NB7-3 Zellstammbaums unterschieden werden, wobei das GW-Neuron nahezu immer posterior zum EW1 und den restlichen EW-Interneuronen liegt (**Abbildung 2**) (Novotny et al., 2002; Rogulja-Ortmann et al., 2008).

Der Zellklon eines jeden NBs des Bauchmarkes konnte durch *Dil*-Markierung präzise verfolgt und kartiert werden (Bossing and Technau, 1994; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Die Situation im Gehirn stellt sich komplexer dar. Hier hat die Charakterisierung von Zellstammbäumen erst begonnen (Technau et al., 2006; Urbach and Technau, 2003a).

NBs und ihre Zellklone bilden sich entlang der A/P-Achse in jedem Hemisegment an analogen Positionen und zu ähnlichen Zeitpunkten und erhalten die gleichen Spezifizierungssignale durch die Segmentpolaritäts- und D/V Musterbildungsgene (**Abbildung 1**). Sie exprimieren daher die gleichen molekularen Marker und bringen ähnliche Nachkommenzellen hervor, weshalb sie als serielle Homologe erachtet werden (Technau et al., 2006). Die Segmente T1-A8 weisen nur geringe Unterschiede in ihrer NB Anzahl auf, wobei T2 als Grundzustand betrachtet werden kann (Lewis, 1978; Technau et al., 2014). Die gnathalen und die terminalen abdominalen Segmente zeigen Unterschiede in der Anzahl ihrer NBs (Birkholz et al., 2013a; Urbach et al., 2016). Diese Beeinflussung Tagma-spezifischer Unterschiede entlang der A/P-Achse wird durch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren vermittelt, die als homöotische Gene oder *Hox*-Gene bezeichnet werden (**Abbildung 2**) (Lewis, 1978; Maeda and Karch, 2006; Technau et al., 2014).

1.2 Der Einfluss der *Hox*-Gene auf die Neurogenese

Hox-Gene stellen evolutionär hoch konservierte Transkriptionsfaktoren dar, welche in großem Maß an der Spezifizierung von Segmentidentitäten beteiligt sind (Lewis, 1978; McGinnis and Krumlauf, 1992). Alle *Hox*-Proteine zeichnen sich durch eine aus 60 Aminosäuren bestehende Homeodomäne aus, welche die DNA Bindung vermittelt (Desplan et al., 1988; Müller et al., 1988). *Hox*-Gene werden während ihrer frühen Expression in parasegmentaler Anordnung exprimiert (Hirth et al., 1998). Ein Parasegment (PS) repräsentiert die fundamentale genetische Einheit, die jeweils aus dem posterioren Kompartiment eines Segments und dem anterioren Kompartiment des nächsten Segments besteht (Martinez-Arias and Lawrence, 1985; Perrimon, 1994). In *D. melanogaster* werden zwei *Hox*-Komplexe unterschieden: der Antennapedia Komplex (Ant-C) (Kaufman et al., 1980) und der Bithorax Komplex (BX-C) (Lewis, 1978; Pearson et al., 2005). Der Ant-C besteht aus den Genen *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) und *Antennapedia* (*Antp*), welche die Kopf-, Gnathal-, und anterioren thorakalen Parasegmente spezifizieren. Der BX-C besteht aus den Genen *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) und *Abdominal B* (*AbdB*), welche die posterioren thorakalen und alle abdominalen Parasegmente spezifizieren (Lewis, 1978; Maeda and Karch, 2006) (**Abbildung 2**). Die Expression der *Hox*-Gene entlang der A/P-Achse erfolgt in der Orientierung, in der sie auf dem Chromosom angeordnet sind.

Dieses Phänomen wird als Co-Linearität bezeichnet (Duboule and Morata, 1994; Maeda and Karch, 2006). Hierbei reprimieren posterior exprimierte *Hox*-Gene die Expression anteriorer *Hox*-Gene, was als posteriore Prevalenz bezeichnet wird (Duboule and Morata, 1994). Daher führt der Ausfall von *Hox*-Genen zu Transformationen ganzer Parasegmente in das nächste anteriore Parasegment. So zeigt die *bithoraxoid postbithoraxoid* (*bx*, *pbx*)-Doppelmutante, bei welcher es sich um regulatorische Mutationen innerhalb des *Ubx*-Gens handelt, Transformationen des T3 Segments nach T2, wodurch eine vierflügelige Fliege entsteht (Bender et al., 1983; Lewis, 1963). Die Tatsache, dass vollständige Segmentidentitäten vermittelt werden, setzt voraus, dass *Hox*-Gene in allen drei Keimblättern aktiv sind und in einem räumlich und zeitlich präzise regulierten Programm unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Ghysen et al., 1985; Hooper, 1986; Immergluck et al., 1990; Lewis, 1978; Michelson, 1994).

Auch während der Neurogenese besitzen *Hox*-Gene spezifische Aufgaben. Im frühen Gastrulastadium nehmen sie Einfluss auf die Spezifizierung des Neuroektoderms und der gebildeten NBs. Beispielsweise kontrollieren *AbdB* und *caudal* (*cad*) beziehungsweise *Dfd* die reduzierte Bildung der NB's in den terminalen abdominalen und gnathalen Segmenten (**Abbildung 2**) (Birkholz et al., 2013b; Urbach et al., 2016). Weiterhin kontrollieren *Hox*-Gene den Teilungsmodus bestimmter NBs und damit die gebildeten Tochterzellen. Der NB6-4 generiert in thorakalen Segmenten Neurone und Glia, während er in abdominalen Segmenten unter Kontrolle von *abdB* nur Glia-Zellen produziert (Berger et al., 2005). Umgekehrt bildet der NB1-1 im Thorax nur Neurone und im Abdomen unter Regulation von *Ubx* und *abdB* Neurone und Glia-Zellen (Prokop and Technau, 1994). Während der späteren Phase haben *Hox*-Gene direkte Einflüsse innerhalb von Neuronen indem sie beispielsweise Gene der Zelladhäsion, Migration, Proliferation und des programmierten Zelltods regulieren (Bello et al., 2003; Gould and White, 1992; Pearson et al., 2005; Rogulja-Ortmann et al., 2008). Beispielsweise wurde gezeigt, dass *Ubx* die Apoptose des GW-Neurons während der späten Neurogenese durch Regulation des pro-apoptotischen Gens *reaper* vermittelt (Rogulja-Ortmann et al., 2008). In *D. melanogaster* wurden kürzlich *Hox* vermittelte Regulationsmechanismen während der Bildung Region-spezifischer Bewegungsmuster beschrieben (Dixit et al., 2008; Friedrich et al., 2016; Picao-Osorio et al., 2015). Eine Regulation von motoneuronaler Identität und Konnektivität konnte auch für einige *Hox*-Gene der Vertebraten gezeigt werden. Sie spielen beispielsweise eine Rolle bei der Spezifizierung und Differenzierung von Motoneuronen während der Innervation der respiratorischen

Muskulatur und der Muskeln der Gliedmaßen (Dasen et al., 2003; Dasen et al., 2005; Lacombe et al., 2013; Philippidou et al., 2012).

Hox-Gene wirken als Selektor-Gene, das heißt sie aktivieren oder reprimieren eine große Anzahl an Zielgenen innerhalb der Zellen und kontrollieren auf diese Weise deren gesamte Morphologie und Physiologie (Garcia-Bellido, 1975; Pradel and White, 1998). Interessanterweise binden alle *Hox*-Proteine *in vitro* nahezu identische DNA-Erkennungssequenzen, welche im Durchschnitt in den meisten eukaryotischen Genomen etwa alle 1000 bp vorkommen. Dies würde bedeuten, dass alle *Hox*-Gene innerhalb eines jeden Gens mehrfach binden könnten (Mann and Chan, 1996). Die Frage bleibt daher, wodurch die *in vivo* beobachteten hoch spezifischen Funktionen der unterschiedlichen *Hox*-Proteine vermittelt werden. Eine mögliche Erklärung für das als „Hox Paradox“ bezeichnete Phänomen (Mann and Chan, 1996; Merabet and Lohmann, 2015) sind *Hox* Co-Faktoren der *Three Amino acid Loop Extension* (TALE)-Familie (Chan et al., 1994). Homothorax (Hth, Meis in Vertebraten) und Extradenticle (Exd, Pbx in Vertebraten) stellen zwei gut charakterisierte Co-Faktoren der TALE-Familie dar, können jedoch alleine nicht den vollen Umfang der *Hox*-Spezifität erklären.

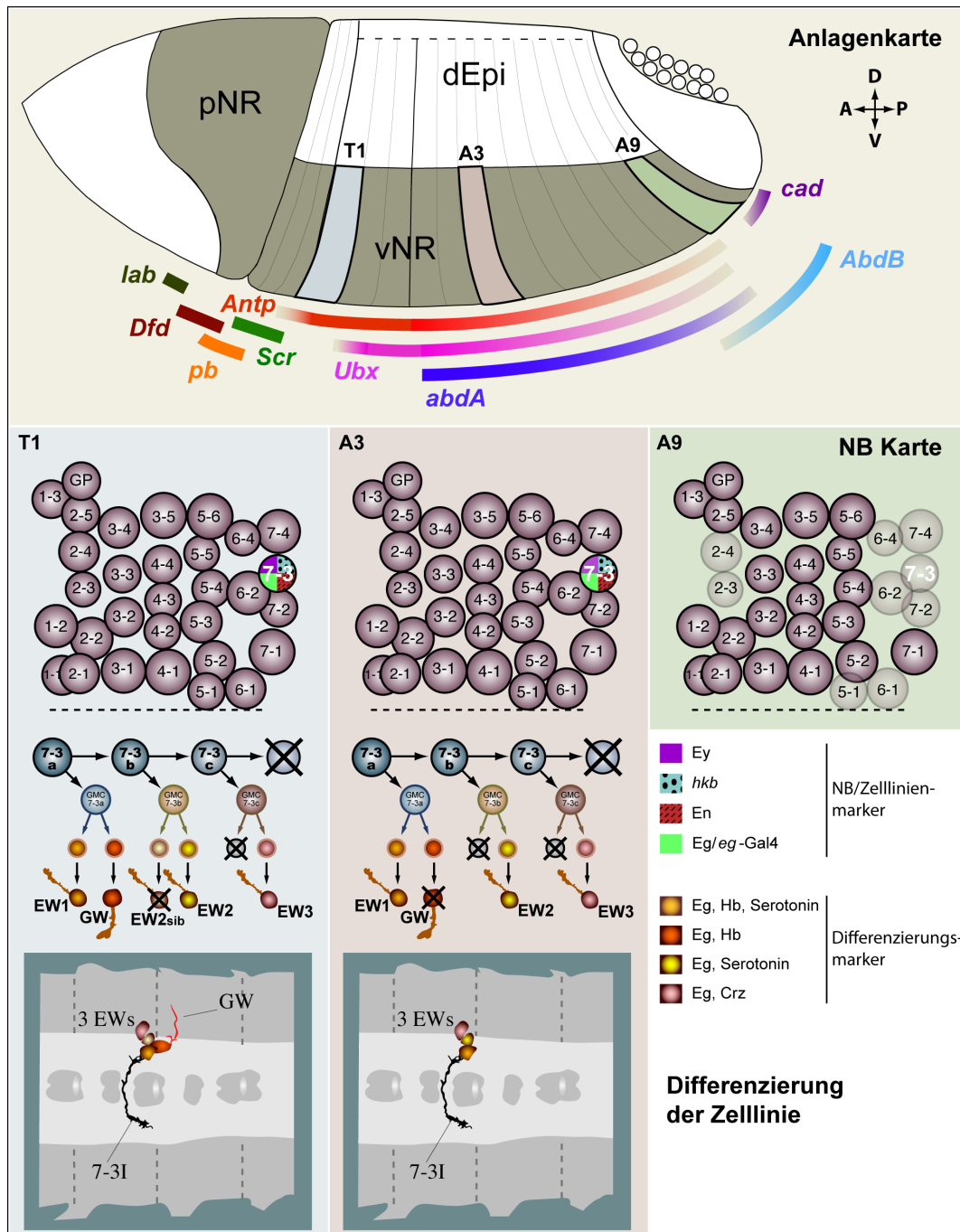


Abbildung 2: Expression der Hox-Gene und Effekte auf die Entwicklung von NB-Zelllinien.

Anlagenkarte des Embryos während des Gastrula-Stadiums. dEpi: dorsale Epidermis, pNR: procephale neurogene Region, vNR: ventrale neurogene Region. Beispielhaft wird das Schicksal des NB7-3 in den verschiedenen Segmenten verfolgt. Dieser kann anhand der spezifischen Marker *En* und *Eg*, sowie *hkb* und *Ey* identifiziert werden. *Hox*-Gene sind während des Gastrulastadiums entlang der A/P-Achse auf spezifische Art und Weise exprimiert. Dort nehmen sie in den jeweiligen (Para-) Segmenten Einfluss auf die dort gebildeten NBs und deren Schicksal. In T1 wird der NB7-3 gebildet und besteht unter Kontrolle von *Antp* aus drei Interneuronen (EWs) und einem efferenten Neuron (GW, Hb positiv, rot). In abdominalen Segmenten besteht der Zellklon nur aus drei Interneuronen. Dies wird durch *Ubx* und *abdA* vermittelt. *Ubx* induziert spezifisch die Apoptose des GW-Neurons (Kreuz) in T3-A8. In den terminalen Segmenten wird durch die Aktivität von *AbdA* und *cad* kein NB7-3 während des Neuroektodermstadiums gebildet. Abbildung verändert nach Technau und Kollegen (Technau et al., 2014).

1.3 Die Entwicklung des neuromuskulären Systems

Grundlegende Bewegungen wie Lokomotion, Respiration und Reproduktion benötigen die koordinierte Verschaltung von Muskeln mit Motoneuronen, was eine Region-spezifische Bildung neuronaler Netzwerke verlangt (Philippidou and Dasen, 2013). Die Ausbildung derartiger Netzwerke ist ein schrittweiser Prozess. Ein Motoneuron bildet zunächst einen axonalen Ausläufer mit einem Wachstumskegel. Mit diesem werden Gradienten chemischer Botenstoffe wahrgenommen, welche attraktive oder repulsive Wirkungen ausüben können (Kolodkin, 1996; Sperry, 1963; Stoeckli and Landmesser, 1998). Anhand dieser Informationen bewegt sich der Wachstumskegel zu seinem Zielgebiet. Dort angekommen werden Kontakte mit der entsprechenden Muskelzelle ausgebildet und stabilisiert. Schließlich differenzieren sich diese Kontakte zu funktionellen Neuromuskulären Verbindungen (NMV) (Prokop, 1999).

In *D. melanogaster* konnten dieser Prozesse detaillierter beschrieben werden (Nose, 2012; Prokop, 1999; Sink and Whittington, 1991). Die sogenannten RP-Neurone (RP1, 3, 4 und 5) des NB3-1 stellen ein gutes zellbiologisches und genetisches Modell dar, an welchen bereits viele Erkenntnisse bezüglich der Wegfindung und Zielspezifität gewonnen wurden (Kolodziej et al., 1996; Labrador et al., 2005; Matthes et al., 1995; Mitchell et al., 1996; Sink and Whittington, 1991; Winberg et al., 1998a). Die Axogenese der RP-Neurone beginnt während des embryonalen Stadiums 12 (**Abbildung 3 A**). In ihrem Verlauf verlassen die Axone durch Ausbildung der Wachstumskegel das ventrale Bauchmark über die Zweige des Intersegmentalen Nerv (ISN) und des Segmentalen Nerv (SN). Im Stadium 14 werden die ersten Muskelfelder erreicht und die Muskeln im frühen Stadium 15 durch erste Ausläufer erkundet (Sink and Whittington, 1991). Während dieser Phase bildet das Neuron viele terminale Ausläufer, welche temporär Kontakte mit richtigen und falschen Muskeln aufnehmen. Korrekte Kontakte werden im Entwicklungsverlauf selektiv stabilisiert und falsche Kontakte werden zurück gebildet (Prokop, 1999).

Die Zielmuskeln selbst bilden, als Myopodia bezeichnete, Membranausläufer, die aktiv Kontakt mit den neuronalen Wachstumskegeln aufnehmen und auf diese Weise helfen, spezifische Kontakte zu stabilisieren (Kohsaka and Nose, 2009). Dabei präsentieren die Muskeln zu diesem Zeitpunkt Zielfindungsfaktoren, die eine individuelle Zielerkennung vermitteln. Diese Faktoren gehören zu unterschiedlichen Proteinklassen, welche sich in zwei Hauptgruppen einteilen lassen (Nose, 2012). Zum einen finden sich homophile

Zelladhäsionsproteine, welche auf den Membranen der Muskeln und ihren innervierenden Motoneuronen exprimiert werden (**Abbildung 3 B**). Beispiele hierfür sind *connectin (con)* oder *Fascilin 3 (Fas3)* (Kose et al., 1997; Nose et al., 1992). Zum anderen werden Proteine von den Muskeln sekretiert. Dadurch entstehen Gradienten, welche den Wachstumskegel entweder anziehen oder abstoßen. Zu ihnen gehören beispielsweise Netrin-B (NetB) und Semaphorin-2a (Sema2a) (Bashaw and Klein, 2010; Labrador et al., 2005; Matthes et al., 1995; Winberg et al., 1998). NetB kann je nach neuronalem Rezeptor attraktiv (Frazzled (Fra), ein Mitglied der *Deleted in Colorectal cancer (DCC)* Rezeptorfamilie) oder repulsiv (Uncoordinated-5 (Unc-5)) sein (Labrador et al., 2005). Neben diesen wurden auch für Morphogene des Hedgehog-, *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β)- und Wnt-Signalweg gezeigt, dass sie unabhängig von ihrer Rolle innerhalb der Bildung von Zellidentitäten während der frühen Entwicklung zusätzlich auch als Wegfindungssignale für Neurone dienen (Charron and Tessier-Lavigne, 2007; Schnorrer and Dickson, 2004). Hierzu gehört zum Beispiel Wnt4 (Inaki et al., 2007). Die Zielfindungsfaktoren besitzen spezifische Eigenschaften und vermitteln je nach Neuron unterschiedliche Reaktionen des Wachstumskegels (Nose, 2012).

Das embryonale und larvale neuromuskuläre System von *D. melanogaster* eignet sich aufgrund der begrenzten Anzahl an präzise identifizierbaren Motoneuronen und Muskeln zur Untersuchung von Neuron-Muskel-Interaktionen. In abdominalen Segmenten besteht das neuromuskuläre System pro Hemisegment aus 30 somatischen Muskeln, welche von 36 Motoneuronen innerviert werden (Landgraf et al., 1997; Nose, 2012). Jedes Motoneuron besitzt ein reproduzierbares Innervationsmuster (Landgraf et al., 1997). Hierbei kann ein Muskel von mehr als einem Motoneuron innerviert werden, beziehungsweise ein Motoneuron kann mehrere Muskeln innervieren (Landgraf et al., 1997; Mauss et al., 2009). Die Axone der Motoneurone projizieren in einen der sechs Zweige der peripheren Nerven: der Intersegmentale Nerv (ISN), bestehend aus ISN, ISNb und ISNd, sowie der Segmentale Nerv (SN) bestehend aus SNa und SNc und der Transverse Nerv (TN) (**Abbildung 3 B**) (Ruiz - Cañada and Budnik, 2006). Die Nerven enthalten dabei sowohl Axone von Motoneuronen des gleichen Segments, als auch Axone aus dem nächst anterior gelegenen Segment (Landgraf et al., 1997; Matthes et al., 1995).

Sind die Kontakt-vermittelnden Prozesse abgeschlossen, beginnt die Differenzierung in eine funktionelle Synapse. Dies geschieht ab dem Stadium 16 und dauert bis zum Ende der Embryogenese. Hierfür müssen die Komponenten der Signalweiterleitung korrekt

lokalisiert werden, um neuronale Aktivität zu initiieren und zu verfeinern (Bate and Broadie, 1995). Weiterhin werden durch Expression von spezifischen Zelladhäsionsmolekülen wie Disc-large (Dlg) die Kontakte zwischen Muskel und Motoneuron stabilisiert (Budnik, 1996). Motoneurone verwenden den Neurotransmitter Glutamat (Jan and Jan, 1976; Nose, 2012; Prokop, 1999). Einige verwenden neben Glutamat auch Peptide oder Amine wie zum Beispiel Insulin, Proktolin oder Oktopamin (Bate and Broadie, 1995).

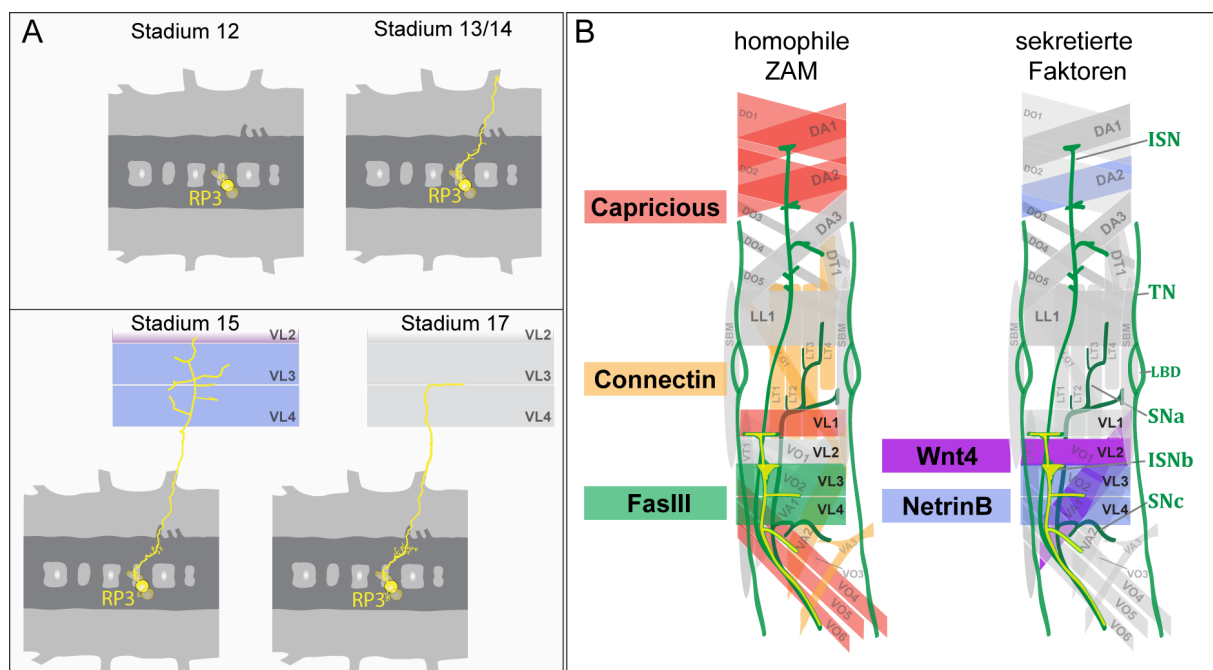


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Regulation von axonaler Wegfindung und Muskelzielfindung am Beispiel des RP3-Neurons.

(A) Das RP3-Neuron beginnt im Embryonalstadium 12 mit der Bildung eines Axons welches während des Stadiums 13/14 das ventrale Bauchmark verlässt. Während des späten Stadiums 14 werden die Muskelfelder der Peripherie erreicht, welche Wegfindungsfaktoren attraktiver (blau) und repulsiver (violett) Natur exprimieren, anhand dessen das Neuron im Verlauf des Stadiums 15 die richtigen Zielmuskeln auswählt. Während der weiteren Entwicklung werden korrekte Kontakte stabilisiert, sodass sich im Stadium 17 eine funktionale neuromuskuläre Verbindung ausbilden kann. (B) Schematische Darstellung des abdominalen neuromuskulären Systems. Die Wegfindungssignale sind in den jeweiligen Muskeln, die sie exprimieren, dargestellt. Die verschiedenen Nerven sind grün gefärbt. Die Projektionen der RP-Neurone sind in gelb dargestellt. Abkürzungen: Intersegmentaler Nerv (ISN), Segmentaler Nerv (SN), Transversaler Nerv (TN), Zelladhäsionsmoleküle (ZAM). (B) nach Nose (Nose, 2012). Nomenklatur der Muskeln nach Bate (Bate, 1993)

1.4 Ziele dieser Arbeit

Hox-Gene sind während der Evolution hoch konservierte Transkriptionsfaktoren. Trotz der intensiven Untersuchung dieser Gene sind einige Aspekte ihrer Funktionsweise wenig verstanden. Dazu gehört die Spezifität ihrer Wirkung auf molekularer und

zellulärer Ebenen. Ein Regulationsmechanismus sind zelltypspezifische Hilfsfaktoren, die das transkriptionelle Programm von Hox-Proteinen an zelluläre Kontexte anpassen. Da bisher neben Exd und Hth kaum Hilfsfaktoren charakterisiert werden konnten, wurde im ersten Teil der Arbeit ein genetischer *Modifier*-Screen in Fliegenaugen durchgeführt um potentielle Interaktionspartner des Hox-Proteins Ubx zu identifizieren. Weiterhin wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, um effizient Protein-Interaktionen potentieller Kandidaten innerhalb lebendender Zellen zu untersuchen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde dann diese Interaktion im zellspezifischen Kontext während der Etablierung neuromuskulärer Netzwerke untersucht und Einflüsse von Ubx auf verschiedene Aspekte der Justierung des neuromuskulären Systems charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Versuchstiere

Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Organismen aufgelistet.

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Binokular	Zeiss	Discovery. V8
Dumont #5SF Pinzetten	Fine Science Tools	11252-00
Fluoreszenzbinokular	Leica	MZFLIII
Fluoreszenzmikroskope	Olympus	BX50WI
	Leica	DM4 B
Geldokumentationssystem	Peqlab	E-BOX VX2
Gelkammer	Hoefler	HE33
Heizblock	Biometra	TB1
Heizschüttler	Eppendorf	Thermomixer Compact
Inkubator	Binder WTB	KB115
Kaltlichtquelle	Schott	KL1500
Kamera (Durchlichtmikroskop)	Kontron	ProgRes 3012
Kamera (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss	AxioCam MRm
Konfokales Laserscanning- Mikroskop	Leica	TCS SP5
Kühlzentrifugen	Eppendorf	Centrifuge 5417R
		Centrifuge 5424R
	Sigma	3K20
Magnetrührer	Heidolph	MR3001
Minutien Nadeln	Fine Science Tools	26002-10
Netzteil (Gelelektrophorese)	Gene Power Supply	GPS200/GPS 400
Nadelhalter	Fine Science Tools	26016-12
PCR-Thermocycler	Biometra	T-Gradient / T-Personal
	Biorad	C1000 Touch™ Thermal Cycler

pH-Meter	Schott	CG840
Photometer	PeqLab	Nanodrop 2000
Pipetten	Gilson	PipetMan
Quecksilberdampflampe	Olympus	U-RFL-T
Schüttler	Heidolph	Rotamax 120
Tischzentrifuge	neoLab	Spectrafuge
Transformator (Fluoreszenzmikroskop)	Olympus	TH3
UV-Tisch	MS-Laborgeräte	Transilluminator N90 M
Vortexmischer	Jahnke & Kunkel	VF 2
Waage	Mettler	AM40 PM4600 Delta Range

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von den Firmen Roth, VWR und Sigma-Aldrich in p.a. Qualität verwendet.

Lösungen und Medien

Lösungen und Medien finden sich jeweils im Kapitel der entsprechenden Methode für welche sie benötigt wurden.

Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
A-tubulin trailer_seq_rev	CACTGATTTTCGACGGTTAC
A2bp1_RK/RJ/RI/RF/RE_GW_fw	CACCATGTATTATCCGCACATG
A2bp1_RK/RJ/RI/RF/RE_GW_rev	TAAATATGGCGTGAAACGATTG
Arm-entry_fw	CACCATGAGTTACATGCCAGCCCAG
ArmC-entry_rv	GCTTGTCTAACAATCGGTATCG
attB-V-armC-ds_fw	gcctcgagaccaagatgagttacatgccag
attB-V-armC-ds_rv	agctctagatgtctaacaatcggtatcgtac
CG11873_fw	CTAGCACCACTTCGTTAAC
CG11873_Sp6_rev	ATTTAGGTGACACTATAGAAGTGGTTGTGGCACCAGTAGTG
CG42671_fw	CAACTGATGACGCGCAGC
CG42671_SP6_rev	ATTTAGGTGACACTATAGAAGTGGACGCATCGCGACGAATG

ColonyPCR_VN173_fwd	ATGGTGAGCAAGGGCGAG
ColonyPCR_VN173_rev	GATGTTGTGGCGGATCTT
Dbr_PB-PF_GW_fwd	CACCATGGATGCTCAGTTTGAG
Dbr_PB-PF_GW_rev	TCAGCGCTGTCGTGTCGAG
Dbr-PB-NheI_rev	AAGGCTAGCTCAGCGCTGTCGTGTCG
Dbr-PB-Sall_fwd	CGCGTCGACATTTCGTAACATGGATGCTCAG
Dsulf1-fwd	GCCTTATAATTGGCGGCC
Dsulf1-rev-SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGTTGAGGAGCGGAGGAAG G
Exd-GWE_fw (A. Rogulja-Ortmann)	CACCATGGAGGACCCCAATC
Exd-GWE_rv (A. Rogulja-Ortmann)	TATGAGGGATTCTCCGGACTG
Gateway cassette_attR1_Seq_fwd	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCTG
mCherry_into_pUAST_KpnI_fwd	TATTGGTACCATGGTGAGCAAGGGCG
mCherry_into_pUAST_XbaI_rev	GACGTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTC
netB_Exon8_fwd	CCATAATCCTGGCACTGGCC
netB_Exon8_SP6_rev	ATTTAGGTGACACTATAGAAGACTGTCGTTGTCCTGCAGAT TG
P1 HSP70 PCR	CCAGCAACCAAGTAAATCAACTG
pVALIUM 20_check_fwd	ACCAGCAACCAAGTAAATCAAC
pVALIUM20_check_rev	TAATCGTGTGTGATGCCTACC
Seq_A2bp1_fwd-1	CAACGGCCAATTCCGGTGG
Seq_A2bp1_fwd-2	CACTAGTCTCAGCAGCGC
Seq_A2bp1_fwd-3	CAATTGGCGCAACTGCAAG
Seq_arm_fwd-3	CATACGCTGACGGCGTTC
Seq_arm_rev_1	GAGTAACCATCTTCTGAAGCC
Seq_dbr_0156_fwd_1	CTGCCAAAAGTGCTCTGC
Seq_dbr_0806_fwd_2	CACAGTTACAGCTTCCGTTC
Seq_dbr_1485_fwd_3	GATCAGCATCCACTTTCC
Seq_dbr_2124_fwd_4	GTTGTGCTCGATAACAGCG
Seq_pMTGal4->CFP_fwd	CTTATCGATACCGTTCGAC
Ubx-GWE_fw (A. Rogulja-Ortmann)	CACCATGAACTCGTACTTTGAACAGG
Ubx-GWE_rv (A. Rogulja-Ortmann)	CTAAGGATCTAAGGATCTAAGG
UbxUbdA-GWE_rv (A. Rogulja-Ortmann)	GATCTACTGATCTAAGTGCTC
VC155 c-ter_RF_Stop_KpnI_rev	TGGCGCGACGCTTAGTGCTAGCTTAggtaccctaGTACAGCTCG TCCATGCCGAGAGTG
VC155 n-ter_RF_rev	GTTCAGCTTTTTTTGTACAAACTTGTGTACAGCTCGTCCATG CCGAGAGTG
VC155c-ter_RF_fwd	AGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGACGatgCCGACAAGCAGAA GAACGGCA
VC155N-ter_RF_KpnI_fwd	TCGTTAACAGATCTGCTACCGGTATGgtaccatgCCGACAAG CAGAAGAACGGCA
VN173 n-ter_KpnI_RF_fwd	TCGTTAACAGATCTGCTACCGGTATGgtaccATGGTGAGCAA GGGCGAGGAGCTGT
VN173c-ter_RF_fwd	AGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGACGATGGTGAGCAAGGGCG AGGAGCTGT
VN173c-ter_Stop_KpnI_rev	TGGCGCGACGCTTAGTGCTAGCTTAGGTACCctaGATGTTGT GGCGGATCTTGAAGTTG
VN173n-ter_RF_rev	GTTCAGCTTTTTTTGTACAAACTTGTGATGTTGTGGCGGATC TTGAAGTTG

Verwendete Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

Name	Hersteller
<i>BshTI (AgeI)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Bsu15I (ClaI)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>NheI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>DNase I recombinant, RNase-free</i>	Roche
<i>FastDigest® BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® BglII</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® DpnI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® EcoRV</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® KpnI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest Sall</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® XbaI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastDigest® XhoI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Q5® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	New England Biolabs
<i>Taq DNA Polymerase (recombinant)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>T4 DNA Ligase</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>T7 RNA Polymerase</i>	Roche
<i>SP6 RNA Polymerase</i>	Roche

Die Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem vom Hersteller angegebenen Puffer verwendet.

Kits und Größenstandards

Tabelle 4: Verwendete Kits und Größenstandards

Name	Hersteller
<i>Orange DNA Loading Dye (6X)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)</i>	Roche

<i>Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>HyperLadder™I,II und IV</i>	Bioline
<i>KAPA HiFi™-PCR-Kit</i>	Peqlab
<i>NucleoBond® Xtra Midi Plus</i>	Macherey-Nagel
<i>pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>QIAprep® Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	Roche
<i>TSA™ Plus Cyanine 3 & Cyanine 5 System</i>	PerkinElmer
<i>Venor® GeM-OneStep Mycoplasma Detection Kit</i>	minerva biolabs, bezogen über Biochrom AG, Berlin

Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Armadillo	Maus	1:50	DSHB (N2 7A1)
beta Galactosidase	Hühnchen	1:1000	Abcam (AB9361)
beta Galactosidase	Kaninchen	1:1000	Cappel (55976)
Cleaved Drosophila Dcp-1 (Asp216)	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technologies (9578)
Cut	Maus	1:20	DSHB (2B10)
dHb9	Kaninchen	1:2000	J. B. Skeath (Broihier et al., 2002)
DIG-AP, fab fragments	Schaf	1:1000	Roche/Sigma (11093274910)
Dimmed	Meerschweinchen	1:750	P. Taghert (Park et al., 2008)
Eagle	Kaninchen	1:10	Dietrich et al. 1997
Eagle	Maus	1:100	C. Q. Doe (Karcavich und Doe, 2005)

Engrailed/Invected	Maus	1:2	DSHB (4D9)
Fasciclin 2	Maus	1:10	DSHB (1D4)
GFP	Maus	1:250	Roche/Sigma (11814460001)
GFP	Kaninchen	1:500	Torrey Pines Biolabs (TP401)
Hunchback	Meerschweinchen	1:500	J. Urban (Mettler et al., 2006)
mCherry	Kaninchen	1:500	Bio Vision
Myosin	Ratte	1:500	Abcam (ab51098)
p35	Maus	1:200	B. Hay (Yoo et al., 2002)
pSMAD 1,5 Ser 463/465 (pMad)	Kaninchen	1:20	Cell Signaling Technologies (9516P)
Ultrabithorax	Maus	1:20	DSHB (FP3.38)
Ultrabithorax	Kaninchen	1:1000	L.S. Shashidhara (Agrawal et al., 2011)
Ultrabithorax	Meerschweinchen	1:200	I. Lohmann

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Huhn-Cy5	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Huhn-FITC	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen-Alexa488	Esel	1:500	Life Technologies
Kaninchen-Alexa 568	Ziege	1:500	Life Technologies
Kaninchen-Alexa647	Esel	1:500	Life Technologies
Maus-Alexa488	Esel	1:500	Life Technologies
Maus-Alexa568	Ziege	1:500	Life Technologies
Maus-Alexa647	Esel	1:500	Life Technologies
Meerschweinchen- DyLight405	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch

Meerschweinchen- DyLight488	Esel	1:250	Laboratories Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen- DyLight649	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Ratte-Alexa633	Ziege	1:500	Life Technologies

Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma *StarSeq* (Mainz) durchgeführt. Genutzt wurde der U-Mix.

Computerprogramme

Es wurden folgende Computerprogramme verwendet:

Tabelle 7: Verwendete Computerprogramme

Name	Hersteller
<i>4Peaks v1.8</i>	<i>www.nucleobytes.com</i>
<i>Adobe Illustrator CS4 Mac</i>	<i>Adobe</i>
<i>Adobe Photoshop CS4 Mac</i>	<i>Adobe</i>
<i>Fiji</i>	<i>Wayne Rasband (National Institute of Health), Open source</i>
<i>LAS AF 2.0</i>	<i>Leica Microsystems</i>
<i>Leica Confocal Software</i>	<i>Leica Microsystems</i>
<i>Mendeley Desktop 1.16</i>	<i>Mendeley Ltd.</i>
<i>Office Mac 2011</i>	<i>Microsoft</i>
<i>Prism 7.0a</i>	<i>Graph Pad Software, Inc.</i>
<i>SnapGene</i>	<i>GSL Biotech LLC</i>

2.1.3 Versuchstiere und Modellorganismen

Bakterienstämme

Tabelle 8: Verwendete Bakterienlinien mit spezifischer Anwendung

Name	Verwendung
<i>DH5 α</i>	Standardklonierungen, Expressionsvektoren
<i>One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli</i> (Thermo Fisher Scientific)	<i>pENTR</i> Klone
<i>One Shot® ccdB Survival™ 2 T1R Competent Cells E.coli</i> (Thermo Fisher Scientific)	<i>BiFC-Destination</i> Vektoren für RF-Klonierungsstrategie

Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden S2R+ Zellen verwendet (Yanagawa et al., 1998), welche von dem *Drosophila Genomics Resource Center* (DGRC, Indiana University, Bloomington, USA) bezogen wurden.

Fliegenstämme

Tabelle 9: verwendete Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
White	<i>w¹¹¹⁸</i>	O. Vef
Wildtyp	<i>Oregon-R-C</i>	Bloomington (#5)
Mutanten		
<i>abdA^{MX1}</i>	<i>abdA^{MX1} / TM3, Sb ,e, Kr-Gal4, UAS-GFP</i>	Bloomington (#3057)
<i>arm⁴</i>	<i>y¹, arm⁴, w* / FM7c, P{ftz/lacC}YH1</i>	Bloomington (#616)
<i>arm⁸</i>	<i>arm⁸, P{FRT(whs)}101 / FM7c, Dfd-GMR-nvYFP</i>	Bloomington (#8557)
<i>fra³</i>	<i>w*; P{FRT(whs)}G13 fra³ / CyO, P{lacZ-un3}276</i>	Bloomington (#8813)

<i>fra</i> ⁴	<i>w</i> [*] ; <i>P</i> { <i>FRT</i> (<i>whs</i>)} <i>G13 fra</i> ⁴ / <i>CyO</i> , <i>P</i> { <i>lacZ-un3</i> }276	Bloomington (#8743)
<i>Ubx</i> ¹	<i>Ubx</i> ¹ / <i>TM6c</i> , <i>Tb</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i> , <i>Dfd-lacZ</i>	A. Rogulja-Ortmann
<i>Ubx</i> ^{6.28}	<i>Ubx</i> ^{6.26} / <i>TM6c</i> , <i>Tb</i> , <i>Sb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i> , <i>Dfd-lacZ</i>	S. Myneni
<i>Wnt4</i> ^{EMS23}	<i>Wnt4</i> ^{EMS23} <i>bw1</i> / <i>CyO</i> , <i>P</i> { <i>HB-lacZ</i> }GS1	Bloomington (#6650)

UAS Stämme

UAS- <i>Ubx</i> ^{la}	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>Ubx</i> ^{la}	A. Rogulja-Ortmann
UAS- <i>CD4::tdGFP</i> _I	<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>P</i> {UAS- <i>CD4-tdGFP</i> }8M1,	Bloomington (#35838)
UAS- <i>CD4::tdGFP</i> _{II}	<i>y</i> ¹ , <i>w</i> [*] ; <i>P</i> {UAS- <i>CD4-tdGFP</i> }8M2	Bloomington (#35839)
UAS- <i>Flybow 1.1</i>	UAS- <i>Flybow 1.1</i> / <i>Gla</i> , <i>Bc</i>	Hadjieconomou et al., 2011
UAS- <i>p35</i>	UAS- <i>P35</i> [<i>BH2</i>]	Bloomington (#5073)
UAS- <i>pan.dTCF</i>	<i>y</i> ¹ , <i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>P</i> {UAS- <i>pan.dTCF</i> }4	Bloomington (#4838)
UAS- <i>pan.dTCF.DN</i>	<i>y</i> ¹ , <i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>P</i> {UAS- <i>pan.dTCFΔN</i> }4	Bloomington (#4784)
UAS- <i>sgg.B</i>	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>P</i> {UAS- <i>sgg.B</i> }MB5	Bloomington (#5361)

UAS RNAi Stämme

UAS- <i>arm</i> RNAi	<i>y</i> ¹ , <i>sc</i> [*] , <i>v</i> ¹ ; <i>P</i> { <i>TRiP.HMS01414</i> }attP2	Bloomington (#35004)
UAS- <i>fra</i> RNAi	<i>y</i> ¹ , <i>sc</i> [*] , <i>v</i> ¹ ; <i>P</i> { <i>TRiP.HMS01147</i> }attP2	Bloomington (#40826)
UAS- <i>mCherry</i> RNAi	<i>y</i> ¹ , <i>sc</i> [*] , <i>v</i> ¹ ; <i>P</i> {UAS- <i>mCherry.VALIUM10</i> }attP2	Bloomington (#35787)
UAS- <i>Ubx</i> RNAi _{II}	<i>y</i> ¹ , <i>sc</i> [*] , <i>v</i> ¹ ; <i>P</i> { <i>TRiP.HMS01403</i> }attP40	TRiP, diese Arbeit
UAS- <i>Ubx</i> RNAi _{III}	<i>y</i> ¹ , <i>sc</i> [*] , <i>v</i> ¹ ; <i>P</i> { <i>TRiP.HMS01403</i> }attP2	Bloomington (#34993)

Gal4 Stämme

24B-Gal4, UAS- <i>mCherry</i>	<i>w</i> ; 24B-Gal4, UAS- <i>mCherry</i> / <i>TM6b</i>	S. Merabet
<i>Act5C</i> -Gal4	<i>y</i> ¹ , <i>w</i> [*] ; <i>P</i> { <i>Act5C-Gal4</i> }25F01 / <i>CyO</i> , <i>y</i> ⁺	Bloomington (#4414)
<i>dHb9</i> -Gal4	<i>w</i> ; <i>dHb9</i> -Gal4 / <i>TM3</i> , <i>ftz-lacZ</i>	J. Skeath, (Broihier et al., 2002)
<i>dimm</i> -Gal4	<i>w</i> [*] ; <i>P</i> { <i>GawB</i> } <i>dimm929 crc929</i>	Bloomington (#25373)
<i>eg</i> -Gal4, UAS- <i>CD4::tdGFP</i>	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>eg</i> -Gal4 [<i>Mz360</i>], <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i>]=UAS- <i>CD4-tdGFP</i> }8M2 / <i>TM3</i> o. <i>TM6b</i>	O. Vef
hs- <i>mFlp5</i> , <i>eg</i> -Gal4	UAS <i>flp5</i> / <i>CyO</i> ; <i>eg</i> -Gal4 / <i>TM6b</i>	O. Birkholz
<i>Mef2</i> -Gal4, UAS- <i>CD4::tdTomato</i>	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>Mef2</i> -Gal4, UAS- <i>CD4::tdTomato</i> / <i>TM3</i> o. <i>TM6b</i>	O. Vef
OK371-Gal4, UAS- <i>CD8::GFP</i>	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>P</i> { <i>GawB</i> } <i>VGlutOK371</i> / <i>CyO</i> ; UAS- <i>mCD8::GFP</i>	A. Bustos ((Mahr and Aberle, 2006)
<i>sca</i> -Gal4	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>sca</i> -Gal4	O. Vef

Rettungsstämme

24B, UAS- <i>mCherry</i> , <i>Ubx</i> ¹	<i>w</i> ; 24B, UAS- <i>mCherry</i> , <i>Ubx</i> ¹ , <i>e</i> / <i>TM6c</i> , <i>P</i> (<i>Dfd-GMR-nvYFP</i>), <i>Tb</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i>	Rekombination
--	--	---------------

<i>Act5C-Gal4; Ubx¹</i>	<i>w; Act5C-Gal4 / CyO, P(Dfd-EYFP); Ubx¹, e / TM6c, P(Dfd-GMR-nvYFP), Tb, Sb, e</i>	2.-3.-Kombination
<i>dHb9-Gal4, Ubx¹</i>	<i>w;; dHb9-Gal4, Ubx¹, e / TM6c, P(Dfd-GMR-nvYFP), Tb, Sb, e</i>	Rekombination
<i>Mef2-Gal4, UAS-CD4::tdTomato, Ubx¹</i>	<i>w;; Mef2-Gal4, UAS-CD4::tdTomato, Ubx¹ / TM6c, P(Dfd-GMR-nvYFP), Tb, Sb, e</i>	Rekombination
<i>sca-Gal4; Ubx¹</i>	<i>w; sca-Gal4 / CyO, P(Dfd-EYFP); Ubx¹, e / TM6c, P(Dfd-GMR-nvYFP), Tb, Sb, e</i>	2.-3.-Kombination
<i>UAS-CD8::GFP; Ubx¹</i>	<i>w¹¹¹⁸; UAS-mCD8::GFP; Ubx¹, e / TM6, Antp^{Hu}, e, iab2-lacZ</i>	A. Rogulja-Ortmann
<i>UAS-Ubx^{la}; Ubx¹</i>	<i>w; UAS-Ubx^{la}; Ubx¹, e / TM6, Antp^{Hu}, e, iab2-lacZ</i>	A. Rogulja-Ortmann

Balancer Stämme

<i>Dr / TM6c, Tb, Sb, e, Dfd-lacZ</i>	<i>Dr / TM6c, Tb, Sb, e, Dfd-lacZ</i>	O. Vef
<i>Dr / TM6c, Tb, Sb, e, P(Dfd-GMR-nvYFP)</i>	<i>Dr / TM6c, Tb, Sb, e, P(Dfd-GMR-nvYFP)</i>	O. Vef
Vierfachbalancer Blau	<i>w; CyO twi-lacZ / Pm; TM6b, Antp^{Hu}, e, iab2-lacZ / CxD</i>	O. Vef
Vierfachbalancer Grün	<i>w; CyO, P(Dfd-EYFP) / Pm; TM6c, P(Dfd-GMR-nvYFP), Tb, Sb, e / CxD</i>	O. Vef
<i>w; CyO, P(Dfd-EYFP) / noc^[Sco]</i>	<i>w; CyO, P(Dfd-EYFP) / noc^[Sco]</i>	O. Vef
<i>y¹, w*, baz⁴ P{FRT(w^{hs})}9-2 / FM7c, P{Dfd-GMR-nvYFP}1, sn⁺</i>	<i>y¹ w* baz⁴ P{FRT(w^{hs})}9-2 / FM7c, P{Dfd-GMR-nvYFP}1, sn⁺</i>	O. Vef
<i>y², cho², v¹/y, hs-hid; CyO/sp</i>	<i>y², cho², v¹/y, hs-hid; CyO/Sp</i>	O. Vef

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1. DNA-Isolation aus Gewebe

Die Isolation von DNA erfolgte jeweils aus 30 L3-Wanderlarven oder zehn Fliegen. Diese wurden zunächst gesammelt, mit Wasser gespült und dann für mind. 30 min bei -80 °C eingefroren. Danach wurden sie auf Eis in 200 µl DNA-Puffer A mit einem Pistill zerkleinert. Nach dem ersten Zerkleinerungsschritt wurden erneut 200 µl DNA-Puffer A zugegeben und die Larven beziehungsweise Fliegen so lange weiter zerkleinert, bis nur noch die Cuticulahüllen übrig blieben. Anschließend wurde das Gemisch für 30 min bei 65 °C inkubiert. Es wurden 800 µl DNA-Puffer B hinzugefügt. Um entstehende

Präzipitate aus der Lösung zu entfernen, wurde der Ansatz für 15 min bei 20 800 g zentrifugiert und 1 ml des DNA-haltigen Überstandes abgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, keine Reste des Präzipitates oder der aufschwimmenden Lipide zu transferieren.

Die DNA wurde nun durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugieren für 15 min bei 20.800 g pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und dann nochmals für 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und das Pellet gründlich getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 100µl dH₂O gelöst.

DNA-Puffer A

100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
100 mM	EDTA
100 mM	NaCl
0,5 %	SDS

DNA-Puffer B

1 Vol.	5 M KAc
2,5 Vol.	6 M LiCl

DNA-Puffer B wurde vor jedem Gebrauch frisch angesetzt.

2.2.2 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Mit einer Agarosegelelektrophorese lassen sich RNA- und DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld, ihrer Größe entsprechend, auftrennen und visualisieren. Die Matrixdichte und somit die Auftrennungsfähigkeit von Nukleinsäuren kann dabei über die Konzentration der Agarose bestimmt werden, das heißt je höher die Konzentration, desto präziser trennen sich kleine Fragmente auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 0,7-1,5 %ige Agarosegele verwendet.

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach einem Abkühlen auf circa 60 °C wurden 20 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) pro 50 ml Puffer hinzu gegeben, die Lösung in einen horizontalen Gelträger gegossen und ein Gelkamm so eingesetzt, dass sich nach dem Polymerisieren Probetaschen bildeten. Der Kamm konnte dann entfernt und das Gel in einem mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer

eingesetzt werden. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben, ihrem Volumen entsprechend, mit einem *6x Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific) gemischt und anschließend in die Gelkammern pipettiert. Als Größenmarker wurde je 5 µl eines adäquaten DNA-Größenstandard (z.B. *Hyper-Ladder 1*, Bionline) aufgetragen. Die DNA wurde bei 100 V aufgetrennt. Durch Anregung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden schließlich sichtbar gemacht und dokumentiert.

TAE-Puffer (50x)

0,2 M	Essigsäure
0,01 M	EDTA (pH 8)
0,4 M	Tris

2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Präparatives Agarosegel

Um spezifische DNA-Fragmente von anderen Fragmenten zu isolieren, wurden präparative Agarosegele verwendet. Hierbei wurden 0,7 %ige Agarosegele hergestellt, bei welchen größere Probentaschen benutzt wurden, sodass größere Probenmengen (ca. 40 µl) in eine Geltasche geladen werden konnten. Nach ausreichender Auftrennung der Nukleinsäuren wurde die Bande von Interesse aus dem Gel ausgeschnitten und das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Reinigung von DNA

Um DNA-Fragmente (Vektor-DNA oder PCR-Amplifikate) nach enzymatischen Reaktionen zu reinigen, wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) oder *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich) nach den beigelegten Anweisungen verwendet.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde von Mullis und Kollegen entwickelt um *in vitro* spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren (Mullis et al., 1986). Durch zwei Oligonukleotide (Primer) wird ein DNA-Abschnitt definiert. Dabei kann einer der Primer

mit dem *antisense* Strang (Forward-Primer) und der andere mit dem kodogenen Strang (Reverse-Primer) spezifisch hybridisieren. Die 3'-Hydroxyenden dienen der DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese neuer Einzelstränge. Ein PCR-Zyklus besteht aus einem Denaturierungs-, Annealing- und einem Elongationsschritt. Die Annealingtemperatur richtet sich hierbei nach der mittleren Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer. Während 25-35 Zyklen in einem Thermocycler wird der DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt.

PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren und/oder zu modifizieren. Je nach Bedarf wurden unterschiedliche PCR-Varianten verwendet.

Der Erfolg der Reaktion wurde im Anschluss überprüft, in dem 5-10 μ l jedes Reaktionsansatzes in einem Agarose-Gel aufgetrennt wurden. Der übrige Ansatz wurde je nach Zielsetzung aufgereinigt und in Folgereaktionen eingesetzt.

Standard PCR

Um spezifisch DNA-Sequenzen mit einer Länge von 100-2000 bp zu amplifizieren, wurde eine Standard-PCR (Tabelle 10 und 11) mit anschließender gelektrophoretischer Analyse durchgeführt. Hierfür wurde die *Taq DNA Polymerase (recombinant)* (Thermo Fisher Scientific) mit beiliegenden Puffern verwendet.

Tabelle 10: Pipettierschema Standard PCR

Reagenz	Eingesetztes Volumen
5'-Primer (10 μ M)	1 μ l
3'-Primer (10 μ M)	1 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
10x KCl-Puffer	5 μ l
Vorlage-DNA (1 pg-3 ng/ μ l DNA)	1 μ l
Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	ad 50 μ l

Tabelle 11: Thermocyclerprogramm Standard PCR

94°C	3 min	Initiale Denaturierung	} 30-35x
94°C	1 min	Denaturierung	
$T_m - 5^\circ\text{C}$	1 min	Annealing	
68°C	1 min/kb	Elongation	
68°C	7 min	Finale Elongation	

Kolonie PCR

Um nach einer Transformation (Kapitel 2.2.5.4) jene Kolonien auswählen zu können, die eine positive Insertion trugen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurden spezifische Primerpaare für das Insert verwendet.

Eine gut separierte Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, auf einer weiteren, mit entsprechendem Antibiotikum versetzte Nährmediumsplatte fein ausgestrichen und der an der Spitze verbleibende Bakterienrest in 50 µl dH₂O resuspendiert. Auf die Nährmediumsplatte wurde ein Raster aufgezeichnet, sodass die Kolonien dem jeweiligen Reaktionsansatz zugeordnet werden konnten. Dies wurde für vier weitere Kolonien wiederholt. Die erhaltene Suspension wurde für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt um die Bakterienzellen zu zerstören und die Plasmide freizusetzen. Anschließend wurden die Zelltrümmer von den in Lösung befindlichen Plasmiden durch einen zwei minütigen Zentrifugationsschritt bei 20.800 g getrennt. 3 µl dieser Lösung wurden als Vorlage für eine anschließende PCR (Tabelle 12 und 13) verwendet und auf den Inhalt des richtigen Integrats getestet.

Tabelle 12: Pipettierschema Kolonie PCR

Reagenz	Eingesetztes Volumen
5'-Primer (10 µM)	0,5 µl
3'-Primer (10 µM)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
10x <i>KCl Puffer</i>	2 µl
Bakterienlösung	3 µl
Taq DNA Polymerase (1 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 13: Thermocyclerprogramm Kolonie PCR

95 °C	Pause		
95 °C	5 min	Initiale Denaturierung	} 30x
95 °C	45 sec	Denaturierung	
T _m -5 °C	45 sec	Annealing	
72 °C	1 min/kb	Elongation	
72 °C	10 min	Finale Elongation	

High Fidelity PCR

Bei Amplifikaten, bei denen es auf eine fehlerfreie Amplifikation von Fragmenten größer als 1000 bp ankam, wurde eine DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet. Es wurden das *KAPA HiFi™-PCR-Kit* der Firma Peqlab oder die *Q5®* von New England Biolabs nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.5 Standardklonierung

2.2.5.1 Amplifikation des Integrats und Restriktionsverdau

Zunächst wurde das Integrat mittels einer PCR amplifiziert. Durch einen geeigneten Entwurf der Oligonukleotide wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen während der PCR eingebaut. Um PCR-Ansätze von Hintergrund erzeugender Vorlage zu reinigen, wurden die Ansätze mit *DpnI* behandelt. *DpnI* ist eine Restriktionsendonuklease, welche spezifisch methylierte DNA schneidet. So werden alle DNA-Moleküle bakteriellen Ursprungs (Dam⁺) von dem Enzym abgebaut und nur die von der DNA-Polymerase *in vitro* synthetisierten Moleküle erhalten. Für die *DpnI*-Verdaue wurde zu dem PCR-Ansatz (45 µl nach Gelanalyse) 1 µl Enzym hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das Integrat mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) gereinigt und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut, um die durch die Primer eingebauten Schnittstellen zu schneiden (Tabelle 14). In einem weiteren Restriktionsansatz wurde der Vektor mit den gleichen Enzymen linearisiert.

Tabelle 14: Pipettierschema Restriktionsverdau

Reagenz	Eingesetztes Volumen
DNA-Lösung (1 µg)	x µl
10x FastDigest® oder 10x FastDigest® Green Buffer	2 µl
Restriktionsenzym FD	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Durch Verwendung des *FastDigest® Green Buffer* konnten die Proben zu Analysezwecken direkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Für Doppel- oder Dreifachverdaue wurden die jeweiligen Enzyme zusätzlich hinzugefügt und das Wasservolumen entsprechend reduziert. Die Ansätze wurden dann zwischen zehn Minuten und 1 h bei 37 °C inkubiert und die Enzyme danach durch Inkubation bei 65 °C für 20 min inaktiviert oder zu Analyse- bzw. Präparationszwecken auf ein Agarosegel geladen. Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, wurden die Ansätze aufgereinigt und konnten dann weiter verwendet werden.

2.2.5.2 Dephosphorylierung

Um eine Religation zu verhindern, wurden verdaute Vektoren vor einer Ligation mit einer Phosphatase behandelt. Um Vektoren vor der Ligation zu dephosphorylieren, wurde dem Restriktionsansatz 1 µl *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt und mit diesem simultan inkubiert.

2.2.5.3 Ligation

Nach der Dephosphorylierung wurde mit Hilfe von Ligasen die geschnittene Vektor-DNA mit der ebenfalls geschnittenen Insert-DNA verknüpft. In dieser Arbeit wurde die T4-Ligase der Firma Thermo Fisher Scientific nach den Angaben des Herstellers verwendet. Durch Verwendung der drei- bis fünffachen Konzentration des Integrats gegenüber dem Vektor begünstigt man die gewünschte Reaktion gegenüber der nicht gewünschten Religation (Tabelle 15 und 16).

Tabelle 15: Pipettierschema Ligation

Reagenz	Eingesetztes Volumen
Vektor (50 ng)	x μ l
Insert (5:1 molares Verhältnis gegenüber dem Vektor)	y μ l
T4-Ligase Puffer	2 μ l
T4-Ligase	1 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

Tabelle 16: Thermocyclerprogramm Ligation

22 °C	Pause	
22 °C	1 h	Inkubation
65 °C	10 min	Inaktivierung

2.2.5.4 Transformation

Um fremde DNA in Bakterienzellen einzubringen, wurden diese transformiert. Nach der Aufnahme der Plasmide konnten mittels der auf diesen Plasmiden enthaltenen Antibiotikaresistenz jene Bakterienklone selektioniert werden, die erfolgreich die Fremd-DNA aufgenommen hatten. Die eingebrachten Plasmide enthielten hierfür eine Multiple Klonierungsstelle, einen bakteriellen Replikationsursprung und ein Resistenzgen zur Selektion gegen ein bestimmtes Antibiotikum. Die Bakterienzellen teilten sich dann in sehr hoher Rate und vermehrten hierüber die eingebrachten Plasmide.

Chemisch kompetente *DH5 α* Zellen, *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* oder *One Shot® ccdB Survival™ 2 T1R Competent Cells E.coli* (Thermo Fisher Scientific) wurden von -80 °C Lagertemperatur auf Eis aufgetaut (siehe Tab.: 8, Verwendete Bakterienlinien mit spezifischer Anwendung). Zu dieser Bakteriensuspension wurden 3-10 μ l DNA-Lösung aus einem Ligationansatz, einer pENTR/D-TOPO Reaktion oder einer RF-Klonierung hinzu pipettiert und dieser Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. In diesem Zeitraum lagerten sich die DNA Moleküle an den Zellwänden der Bakterien an. Danach erfolgte der Hitzeschock für die *DH5 α* für 2 min bei 42 °C. Die kommerziellen Bakterienstämme wurden nach Angaben des Herstellers behandelt. Nach dem Hitzeschock wurde zu den Bakterienzellen 250 μ l vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt und das Gemisch bei 37 °C für 1 h inkubiert. In dieser Zeit bildete sich die Antibiotikaresistenz aus, welche anschließend dazu verwendet wurde, um die Zellen auf

einer der Plasmidresistenz entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatte zu selektionieren. Hierfür wurde die Zellsuspension mit einem sterilisierten Drigalskispatel auf einer Agarplatte ausgestrichen. Solche Zellen, die das Plasmid durch die Transformation aufgenommen hatten, besaßen die entsprechende Antibiotikaresistenz, wohingegen die Zellen, welche keine Antibiotikaresistenz erworben hatten, in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Die Agarplatten wurden für 16h bei 37 °C inkubiert.

LB-Ampicillin-Platten

Auf 1 l LB-Medium 15 g Bacto-Agar geben und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C 75 mg Ampicillin zugeben. In sterile Petrischalen gießen. Lagerung bei 4 °C.

SOC-Medium

2 %	Trypton (w/v)
0,5 %	Hefeextrakt (w/v)
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glucose

sterile Lagerung bei 4 °C

2.2.5.5 Plasmidpräparation

Nach einer Transformation wurden die Plasmid-Moleküle in den jeweiligen Bakterienzellen vermehrt. Um sie aus diesen zu isolieren, wurden das *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) und das *NucleoBond® Xtra Midi Plus* (Macherey & Nagel) verwendet. Die erstgenannten wurden für Isolationen im kleinen Maßstab verwendet. Um die Vektoren für Keimbahntransformation oder zur Anwendung in der Zellkultur in sauberer Form und entsprechendem Maßstab zu isolieren wurde das dritte Kit verwendet.

Minipräparation

Um die Plasmide aus den Bakterienzellen zu gewinnen, wurde das „*QIAprep® Spin Miniprep Kit*“ (Qiagen) und das *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Midipräparation

Um Plasmide für Keimbahntransformationen und die Zellkultur zu gewinnen, wurde das *NucleoBond® Xtra Midi Plus – Kit* (Macherey & Nagel) nach dem beigelegten Protokoll unter Verwendung einer Vorkultur angewendet.

LB-Medium

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl

in 900 ml Aqua dest. lösen, pH 7 mit 5 N NaOH einstellen und autoklavieren

LB-Ampicillin-Medium

75 µg Ampicillin je ml LB-Medium

2.2.6 Restriktionsfreie-Klonierung

Als Alternative zur klassischen Klonierungsstrategie wurde Restriktionsfreies Klonieren verwendet (Unger et al., 2010; van den Ent and Löwe, 2006). Diese Methode fand ihre Anwendung, um die in dieser Arbeit verwendeten BiFC-Destination Vektoren, sowie den pENTR_arms zu erzeugen.

In einem ersten PCR-Schritt (Tabelle 17 und 19) wurden sogenannte Megaprimer produziert, die sich durch mit dem Zielvektor hybridisierende Überhänge von etwa 25 bp Länge auszeichneten. Hierfür wurden die Primer so entworfen, dass sie zu 25 bp mit dem zu amplifizierenden Fragment und zu 25 bp mit der Insertionsstellen in das Zielplasmid zu hybridisieren vermochten. Nach der Reinigung mit dem *PCR-Purification Kit* (Qiagen) wurden diese Megaprimer in einem zweiten PCR-Schritt eingesetzt (RF-PCR, Tabelle 18 und 19). Hier dienten nun die erwähnten Überhänge als Hybridisierungsstellen mit dem Zielmolekül, deren 3' OH-Enden der DNA-Polymerase

(KAPAHiFiTM-PCR-Kit, PeqLab) als Ausgangspunkt für die Synthese des Komplementärstranges dienten.

Zur Reduzierung von Hintergrund produzierenden Parentalplasmiden wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit *Fast Digest DpnI* (Thermo Fisher Scientific) für eine Stunde inkubiert und anschließend bei 80 °C für 5 min inaktiviert. *DpnI* ist eine Restriktionsendonuklease, welche spezifisch methylierte DNA abbaut und so alle DNA-Moleküle entfernt, welche eine bakterielle Abstammung aufweisen, also nicht von der DNA-Polymerase *in vitro* synthetisiert wurden.

Die in der Reaktion entstehenden Einzelstrangbrüche innerhalb des Plasmidmoleküls wurden nach der Transformation in chemisch kompetente *DH5α*-Zellen durch endogene Reparatursysteme von diesen repariert und das Plasmid vervielfältigt. Im Anschluss wurde mit dem *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (Qiagen) die rekombinanten Plasmide isoliert und der Erfolg der RF-Klonierung mittels einer Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.4) mit anschließendem Testrestriktionsverdau überprüft (Kapitel 2.2.5.1).

Tabelle 17: Pipettierschema der ersten RF-PCR

Reagenz	Eingesetztes Volumen
5'-Primer (10 µM)	2 µl
3'-Primer (10 µM)	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
5x HF oder GC Puffer	10 µl
DNA Vorlage (cDNA, 3ng/µl)	1 µl
KAPA HiFi DNA-Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 18: Pipettierschema der zweiten RF-PCR

Reagenz	Eingesetztes Volumen
1. MP (100 ng)	x µl
2. MP (äquimolar zu 1. MP)	y µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
5x HF oder GC Puffer	10 µl
DNA Vorlage (z.B. pUASg.attB 20ng/µl)	1 µl
KAPA HiFi DNA-Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 19: Thermocyclerprogramm des RF-Klonierens

95 °C	Pause	Hot Start	
95 °C	2 min	Initiale Denaturierung	} 30x
98 °C	20 sec	Denaturierung	
60 °C	30 sec	Annealing	
72 °C	30 sec/kb	Elongation	
72 °C	5 bzw. 8 min	Finale Elongation	

2.2.7 Gateway-Klonierung

Bei der Gateway-Klonierungsmethode handelt es sich um eine vielseitige und effiziente Methode, um ein Zielgen in eine Vielzahl unterschiedlicher Expressionsvektoren einzubringen. Die Technik beruht auf dem natürlichen Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Zunächst wird durch verschiedene Methoden ein sogenannter ENTRY Vektor erzeugt, der die gewünschte cDNA enthält. In einem nachfolgenden Schritt wird durch eine Rekombinationsreaktion zwischen den *attachment sites* des ENTRY Vektor mit denen eines Destination Vektors die cDNA transferiert und ein Expressionsvektor erzeugt.

2.2.7.1 Erzeugung eines ENTRY-Vektors mittels des D-TOPO Kits

In dieser Arbeit wurden ENTRY Vektoren mit dem *pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet, sowie Restriktionsfreies-Klonieren um den *pENTR_arm* (Vorlage LD23131) zu erzeugen. Die Konstrukte *dbr*, *exd*, *UbxIa*, *UbxIIa* und *UbxIva* wurden von cDNAs amplifiziert, welche von Dr. Ana Rogulja-Ortmann erhalten wurden. *A2bp1* wurde vom LD15974 amplifiziert. Das *Ubx^{UbdA}* Konstrukt wurde von Dr. Samir Merabet, Lyon erhalten.

LB-Kanamycin-Medium

50 μ g Kanamycin je ml LB-Medium

LB-Kanamycin-Platten

15 g Bacto-Agar pro Liter LB-Medium mischen und autoklavieren, auf 60 °C abkühlen lassen, mit 50 mg Kanamycin versetzen und in Petrischalen gießen. Bei 4 °C lagern

2.2.7.2 Erzeugung eines Expressionsvektors

Um cDNAs aus den ENTRY Vektoren in die, in dieser Arbeit generierten Destination Vektoren, zu transferieren, wurde der *Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.8 Sondenherstellung

Alle Sonden in dieser Arbeit wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Sie tragen eine *Digoxigenin (DIG)*-Markierung, welche sich mit anti-DIG Antikörpern detektieren lässt. Für die *in vitro*-Transkription wurde zunächst eine DNA-Matrize benötigt; In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung um diese Matrizen herzustellen. Beide orientierten sich an einer von Weizmann und Kollegen publizierten Vorgehensweise (Weizmann et al., 2009).

Als eine Methode wurden *Expressed Sequence Tags (EST)* verwendet, welche in einer Bibliothek im Institut für Genetik in Mainz vorlagen (Stapleton et al., 2002). Aus der Bibliothek konnten die gewünschten Klone auf passenden Antibiotika-Platten ausgestrichen werden und von diesen durch Herstellung einer Übernachtskultur Plasmid-DNA isoliert werden (siehe Kapitel 2.2.5.5). Durch einen Restriktionsverdau mit dem entsprechenden Enzym wurden 3 µg Vektor DNA (in einem 100 µl Ansatz) so linearisiert, dass durch die entstehende Schnittstelle am 3'-Ende der Endpunkt für die Transkription festgelegt werden konnte. Hierbei wurde die Schnittstelle so gewählt, dass eine circa 300-1000 bp lange Sonde entstand. Kürzere Sonden weisen sehr häufig eine zu geringe Spezifität *in situ* auf während zu lange Sonden Schwierigkeiten besitzen, in das Gewebe einzudringen. Die geschnittene DNA wurde mit 1/10 Volumen 2 M NaCl (DEPC) und 2,5 Volumen 100% Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde diese Probe für mindestens 45 min bei 4 °C und 20 800 g zentrifugiert und das Pellet anschließend gewaschen, indem es in 70 %igem Ethanol-DEPC für 10 min bei 4 °C und 20 800 g zentrifugiert wurde. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet im Thermoschüttler für 1-2 min bei 50 °C getrocknet. Das Pellet wurde dann in 16 µl ddH₂O (DEPC) gelöst. Der Erfolg wurde auf einem DNA-Gel überprüft.

Als weitere Methode zur Herstellung eine DNA Matrize wurde eine PCR-basierte Strategie verwendet (Weizmann et al., 2009). Hierfür wurde zunächst ein Primerpaar entworfen, welches gegen das größte Exon des Zielgens komplementär war. Dem

Reverse Primer wurde dabei am 5'-Ende eine SP6 RNA Polymerase Promotorsequenz angehängt, welche eine Transkription der Sonde erlaubte. Mittels einer Standard PCR (Kapitel 2.2.4) wurde so ein Amplifikat erzeugt und auf einem Gel überprüft. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des *PCR-Purification Kits* (Qiagen) gereinigt (Kapitel 2.2.3). Die Elution erfolgte hierbei mit 35 µl ddH₂O(DEPC).

Für die *in vitro* Transkription wurde das *DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)* (Roche) verwendet. Der Ansatz (Tabelle 20) wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die DNA-Vorlage zu entfernen, wurde das Gemisch danach mit 2 µl *DNaseI* (RNasefrei, Roche) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Um diese Reaktion zu stoppen, wurden 2 µl 0,2 M EDTA-DEPC hinzu pipettiert und das Gemisch im Anschluss erneut über Nacht gefällt. Die Fällung der RNA wurde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl-DEPC und 70 µl 100 % Ethanol herbeigeführt. Am nächsten Morgen wurde die RNA-Sonde wie zuvor beschrieben zentrifugiert und gewaschen und das Pellet in 50 µl ddH₂O (DEPC), welches mit 0,5 µl RNase Inhibitor versetzt wurde, gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 20: Pipettierschema der *in vitro* Transkription

Reagenz	Eingesetztes Volumen
Ca. 3 µg DNA	14 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
DIG-Nukleotidmix	2 µl
T7-Polymerase	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl

2.3 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden S2R+ Zellen verwendet. Bei S2R+ Zellen handelt es sich um eine embryonale Zelllinie, welche ein Derivat der von Schneider isolierten Zelllinie (S2) darstellt (Schneider, 1972). Im Gegensatz zu der Ausgangszelllinie S2 handelt es sich bei den S2R+ um adherente Zellen, welche sich durch die Expression der Wingless Rezeptoren *Dfrizzled-1* und *Dfrizzled-2* auszeichnen (*S2 receptor plus*) (Yanagawa et al., 1998).

Die Kultivierung und die Experimente orientierten sich an Protokollen des *Drosophila Genomics Resource Center* (DGRC, Indiana University, Bloomington, USA). Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die Zellen wurden zweimal pro Woche in frisches M3-

Zellkulturmedium im Verhältnis 1:3 oder 1:5 durch Lösen der Zellen mittels eines Zellspatels transferiert. Bei dem Medium handelte es sich um steril filtriertes Shield and Sang Standardmedium (Sigma, S8398-1L) mit 10 % fötalem Kälberserum (Thermo Fisher Scientific, 16000-036) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Sigma, P4333). Die Haltung erfolgte in einem Inkubator bei 25 °C in Zellkulturflaschen mit 6 ml Arbeitsvolumen. Eine Kulturperiode wurde nicht länger als 30 Passagen durchgeführt. Es wurde regelmäßig überprüft, dass die Kultur frei von einer Mycoplasmen-Kontamination war, indem das *Venor® GeM-OneStep Mycoplasma Detection Kit* (minerva biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet wurde.

Shield and Sang M3-Medium

39,36 g Shields and Sang Pulver (Sigma, S8398-1L)

0,5 g KHCO_3 auf pH 6.6 einstellen, sofern nötig

1 g Hefeextrakt (Sigma Y-1000)

2,5 g Bactopepton (Difco 211677)

alles lösen und mit einem 0.2 μm Filter in sterile Flaschen filtrieren, 50 ml Aliquot beiseite legen, den Rest mit hitzeinaktiviertem 10 % fötales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzen. Bei 4 °C lagern.

2.3.1 Transfektion von S2R+ Zellen

Transfektionen von Zellkulturzellen wurden durchgeführt um rekombinante Proteine für das BiFC System zur Expression zu bringen und Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren. Es wurden Zellen zwischen der zehnten und dreißigsten Passage verwendet.

Hierfür wurden am ersten Tag Zellen aus einer konfluenten Kulturflasche in einer definierten Zelldichte von 500.000 – 600.000 Zellen/ml in gekammerten Objektträgern (μ -Slide 8 Well, ibiTreat, ibidi) oder in 6-well Platten ausgesät. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Pro Kammer des Objektträgers wurden 250 μl Zellsuspension verwendet. Für 6-well Platten wurden 3 ml Zellsuspension benutzt. Die Transfektion erfolgte 24 h nach Aussaat. Zwei Stunden vor der Transfektion wurden bei den gekammerten Objektträgern die 250 μl des Ansatzes gegen 200 μl frisches Medium getauscht. Alle Reagenzien (Tabelle 21) wurden vor der Transfektion auf Raumtemperatur erwärmt. *Fugene HD*-Kit (Promega) wurde nach den Angaben des

Herstellers angewendet. Die Transfektionsansätze wurden vorsichtig auf die Zellen gegeben um ein Ablösen der Zellen zu minimieren. Vier Stunden nach Transfektion wurde die Expression der rekombinanten Proteine durch Induktion des Schwermetallpromotors des *pMTGal4_UAS mCherry* durch Zugabe von 100 μM CuSO_4 induziert. Die Zellen wurden für 44 h weiter inkubiert und dann am konfokalen Mikroskop analysiert.

Tabelle 21: : Pipettierschema der Transfektion von S2R+ Zellen

Reagenz	8 well iBidi	6-well
pMT Gal4_UAS mCherry	62,5 ng	1,25 μg
pUASg.VN173_X	125ng	2,5 μg
pUASg.VC155_Y	125ng	2,5 μg
Fugene HD	2 μl	20 μl
M3 -Serum - Pen/Strep	ad 50 μl	ad 500 μl

2.4 Bimolekularer-Fluoreszenter-Komplementationstest (BiFC)

Um Protein-Protein-Interaktionen zu testen, wurde ein von Hudry und Kollegen für Embryonen entwickeltes Analyseverfahren auf kultivierte S2R+Zellen übertragen (Hudry et al., 2011). Bimolekulare Fluoreszenz beruht auf der Eigenschaft des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) und seiner Derivate wie Venus (V), dass sich die N-terminale Hälfte (Aminosäuren 1-173, VN173) und C-terminale Hälfte (Aminosäuren 155-238, VC155) bei räumlicher Nähe wieder zu einem funktionalen Protein zusammenlagern (Kerppola, 2009). Die einzelnen Hälften besitzen hierbei keine Fluoreszenz. Werden diese N- bzw. C-terminalen Hälften jeweils mit zu untersuchenden Interaktionspartnern fusioniert und gemeinsam exprimiert, erlaubt die entstehende Fluoreszenz Rückschlüsse über die Interaktionseigenschaften der untersuchten Proteinpartner zu ziehen. In dieser Arbeit wurde Venus an Stelle von GFP als optimierter Fluorophor verwendet (wie bei Hudry et al., 2011). Es wurden nur N-terminale Fusionen verwendet, wobei Ubx immer mit dem VC155-Fragment fusioniert wurde. Als Negativkontrolle wurde ein mutiertes Ubx Protein verwendet ($\text{Ubx}^{\text{Ubd}_a}$), welches eine stark reduzierte Interaktionskapazität mit dem als Positivkontrolle verwendeten Interaktionspartner Extradenticle (Exd) besitzt (Merabet et al., 2007).

Hierfür wurden Zellen, wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben, mit dem Treiberplasmid *pMTGal4_UAS-mCherry* zur Expression von Fusionsproteinen aus Ubx bzw. dem zu analysierenden Protein und den jeweiligen Venus-Hälften gebracht. Lag eine Interaktion zwischen den beiden Partnern vor, so konnte diese als Fluoreszenzsignal in den Zellen detektiert werden. Die Analyse erfolgte an einem Konfokalen Mikroskop Leica TSC SP5 mit einem 20x Objektiv. Hierfür wurden Bildstapel einer Zellschicht mit exakt gleichen Einstellungen zwischen Experiment und Kontrolle aufgenommen. Jedes Experiment wurde in drei biologischen Replikaten wiederholt. Es wurde darauf geachtet, keine übersättigten Pixel aufzunehmen. Die Auswertung der Bildstapel wurde mit FIJI (NIH) nach einem Protokoll von Andreas Vonderheit (Institut für Molekulare Biologie, Mainz) durchgeführt. Zunächst wurde eine Maximalprojektion hergestellt. Die einzelnen Kanäle des Bildes wurden dann in ein 8 Bit Monochrombild gewandelt. Danach wurde durch Threshold- und Median Filter-Einstellungen nicht zelluläre Partikel entfernt. Mit der Watershed-Funktion konnten nahe beieinander liegende Zellen getrennt werden. Hiermit lag im Falle des mCherry Kanals eine Maske der Zellumrisse vor. Diese erlaubte zum einen ein automatisches Zählen der transfizierten Zellen. Zum anderen konnte die so generierte Maske verwendet werden, um die Fluoreszenzintensität der BiFC Signale innerhalb der Zellen durch Multiplikation mit der Fläche zu messen.

2.5 Fliegenarbeit

2.5.1 Fliegenhaltung

Die verwendeten Fliegenstämme wurden in Aufzuchtgefäßen aus Kunststoff auf einem hefehaltigen Nährmedium gehalten. Dabei wurden je nach Zielsetzung Gefäße verschiedener Größe verwendet (Durchmesser 10 mm, 25 mm oder 50 mm). Die Aufzuchtgefäße wurden mit luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen. Die Generationszeit von *Drosophila* ist abhängig von der Umgebungstemperatur. Sie beträgt bei 25 °C im Durchschnitt 10 Tage und bei 18 °C etwa 20 Tage. Dies wurde genutzt um Fliegenstämme auf großen Röhrchen bei 25 °C in großer Anzahl zu halten und zu vermehren, wie sie für das Sammeln von Jungfrauen oder Embryonen benötigt wurden. Solche Stämme, welche nicht regelmäßig und nur in kleiner Anzahl benötigt wurden, wurden bei 18 °C gehalten.

Nährbrei

450 g Hefefocken, 250 g Sojamehl und 2500 g Maisgries in warmem Wasser einweichen und durchmischen. 2500 g Malzextrakt und 1100 g Zuckerrübensaft abwiegen, heißes Wasser zugeben und gut durchmischen. 10 l Wasser in einem Topf erwärmen. 230 g Agar für 15 min in kaltem Wasser einweichen und anschließend in 10 l aufgewärmtes Wasser geben. Rühren, bis sich der Agar löst. Die restlichen Zutaten untermischen und mit 3 l Wasser auffüllen. Brei bei 100 °C kurz aufkochen und danach auf 80 °C abkühlen lassen. In 3 l heißem Wasser 60 g Nipagin lösen und mit 130 ml Propionsäure zum Brei geben. Gut durchmischen. Den fertigen Nährbrei in saubere Aufzuchtröhrchen abfüllen und erkalten lassen. Lagerung bei 4°C.

2.5.2 Kreuzungen

Um gezielt Kreuzungen für diverse genetische Zielsetzungen durchzuführen, wurden zunächst jungfräuliche, weibliche Fliegen gesammelt. Es wurden dazu die frisch aus der Puppe geschlüpften Fliegen bei 25 °C alle vier Stunden abgesammelt und die Weibchen von den Männchen separiert. Männchen benötigen acht Stunden bis zur Geschlechtsreife, sodass man bei einem Sammelintervall von vier Stunden sicher sein konnte, Jungfrauen zu isolieren. Weiterhin zeichnen sich junge Fliegen durch das Vorhandensein des durch die Cuticula sichtbaren Meconiums aus (Greenspan, 2004).

Die gesammelten Jungfrauen wurden dann mit den entsprechenden Männchen gekreuzt. Dafür wurden, je nach Bedarf, zwischen fünf bis 75 jungfräuliche Weibchen mit jeweils halb so vielen Männchen verpaart. Je nach Anzahl der Fliegen wurden unterschiedlich große Fliegenröhrchen verwendet. Für die Etablierung neuer Stämme wurden zumeist kleinere Ansätze von etwa sieben bis zehn Fliegen in kleinen Röhrchen gewählt, während für das Sammeln von Embryonen bis zu hundert Fliegen auf großen Röhrchen angesetzt wurden.

2.5.3 Balancer Chromosomen

Ein entscheidender Vorteil der Arbeit mit *D. melanogaster* gegenüber allen anderen Modellorganismen ist das Vorhandensein gut etablierter Balancerchromosomen (Greenspan, 2004). Sie erlauben die stabile Erhaltung homozygot letaler Allele in einem heterozygoten Zustand. Das Prinzip der Balancerchromosomen geht zurück auf Hermann Müller, der bereits 1926 durch Röntgenstrahlung die ersten

Balancerchromosomen generieren konnte (Venken and Bellen, 2014). Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein dominanter Marker aus, welche eine präzise, visuelle Verfolgung der Chromosomen während Kreuzungsprozeduren erlaubten. Diese Marker lassen sich embryonal, larval, pupal und im Adultus ausmachen. Hierbei handelt es sich zum einen um Reportergene auf den Balancerchromosomen, welche fluoreszent oder mittels einer Antikörperfärbung nachweisbar sind und eine genaue Genotypisierung von Embryonen und Larven erlaubt. Zum anderen beinhalten sie immer visuelle Marker an gut erkennbaren Strukturen der adulten Fliege, wie Borsten, Flügel oder Augen. Durch große, nahezu das ganze Chromosom abdeckende Inversionen wird eine Rekombination während der Meiose verhindert. Gleichzeitig generieren diese Inversionen auf dem Balancerchromosom rezessive, embryonal letale Mutationen, sodass sie homozygot nicht lebensfähig sind.

2.5.4 Ektopische Genexpression mit dem UAS/Gal4-System

Bei dem UAS/Gal4-System handelt es sich um eine von Brand und Perrimon im Jahre 1993 entwickelte Methode, welche sich aus zwei Komponenten zusammen setzt (Brand and Perrimon, 1993).

Bei Gal4 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), der an *upstream activating sequences* (UAS) bindet und als Aktivator für *downstream* liegende Gene dienen kann. Diese Eigenschaft wurde für die Fliegen-genetik ausgenutzt, in dem man das mit einem schwachen Promotor ausgestattete Gal4-Gen mit einem Enhancer-trap-Experiment künstlich unter die Kontrolle von Treibergenen brachte. Das Gal4-Gen wird in diesen Linien im Expressionsmuster des Treibergens aktiviert. Durch Generierung von UAS-Konstrukten als zweite Komponente, wie sie durch eine P-Element vermittelte Keimbahntransformation erhalten werden können, kann man nach dem Kreuzen der Gal4-Linie mit der UAS-Linie beide Systemkomponenten in einem Genom vereinigen und so das UAS-Konstrukt im Muster des Treibergens aktivieren und analysieren. Mittels Auswahl der geeigneten Treiberlinien können so der Expressionsort und Expressionszeitpunkt präzise gesteuert werden.

Für diverse genetische Untersuchungen wurden Fliegen in großen Ansätzen (siehe Kapitel 2.5.2) miteinander verpaart und die hieraus erhaltenen Embryonen für die Immunhistochemie verwendet.

2.5.5 RNA-Interferenz

Viele Gene besitzen pleiotrope Effekte, was Mutantanalysen häufig erschwert, besonders wenn der Verlust der frühen Funktion des Gens letal wirkt. Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al., 1998) und ihre gentechnische Nutzbarmachung im Rahmen des Gal4/UAS-Systems erlaubt die Reduktion einer Genfunktion in einer räumlichen und zeitlich kontrollierten Art und Weise (Dietzl et al., 2007; Ni et al., 2011). Somit lässt sich in *Drosophila* das Genprodukt nahezu jedes protein-kodierenden Gens in einem räumlichen und zeitlichen Muster reduzieren und der dadurch ausgelöste Effekt studieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Linien stammten ausschließlich aus einer zweiten Generation an transgenen Linien, die sich durch die induzierbare Expression von *short hairpin RNAs* auszeichnen (shRNA). Diese shRNAs besitzen den Vorteil, dass sie keine Prozessierungsschritte benötigen und dadurch sehr effizient wirken. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig für die embryonale Analyse von Gen-*knockdowns*. Um diese Effizienz noch weiter zu verstärken, wurden alle Experimente bei 29 °C durchgeführt, da das UAS/Gal4 System bei diesen Temperaturen effektiver arbeitet.

2.5.6 Einzelzellmarkierung mittels *Flybow*

Mit Hilfe des *Flybow1.1*-Systems lassen sich innerhalb komplexer Gal4-Expressionmuster einzelne Zellen nach dem Zufallsprinzip markieren um ihre Morphologie zu studieren (Hadjieconomou et al., 2011). Das System beruht auf dem UAS/Gal4 System. Hierbei wurde eine Genkassette generiert, welche sich aus membrangebundenen Fluorophoren unterschiedlicher Anregungswellenlängen zusammensetzt. Diese Fluorophore sind mit modifizierten Rekombinationsstellen (*mFRT71*) unterschiedlicher Orientierung versehen. Eine von einem Hitzeschockpromotor regulierte *Flipase* (*hs-mFlp5*) erkennt diese *FRT*-Stellen. Sie kann sowohl reversible Inversionen, wenn die modifizierten *FRTs* in entgegengesetzter Orientierung auf dem Chromosom lokalisiert sind, als auch irreversible Exzisionen, wenn die modifizierten *FRTs* in gleicher Orientierung lokalisiert sind, katalysieren. Diese Reaktion führt dazu, dass innerhalb einer Zelle durch das Zufallsprinzip der Reporter *CD8::EGFP* durch einen der drei weiteren Fluorophore *PM::mCitrine*, *CD8::mCherry* oder *CD8::Cerulean-V5* ersetzt wird, sodass aus dem breiten GFP-Muster einzelne Zellen oder Zellgruppen in einem anderen Farbstoff hervor treten und diesen nach Beendigung des Hitzeschocks stabil exprimieren. Die Wahl des Hitzeschock-Zeitpunkts entscheidet

hierbei, welcher Zelltyp zu einem bestimmten Zeitpunkt präferentiell markiert wird.

In dieser Arbeit wurde das in **Abbildung 4** gezeigte Protokoll verwendet, um das Projektionsmuster des GW-Neurons innerhalb des *eagle*-Gal4 Expressionsmusters in Embryonen und Larven darzustellen (Dittrich et al., 1997; Higashijima et al., 1996). Für die embryonale Analyse des Projektionsmusters wurden Embryonen nach dem gezeigten Protokoll behandelt, dechorionisiert, fixiert, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet, wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben. Für die Analyse des Projektionsmusters in larvalen Stadien L1 und L3 wurden zunächst Embryonen nach dem unten genannten Protokoll behandelt. Die späten Embryonen, die hieraus hervorgingen, wurden chemisch dechorionisiert, gut mit Wasser gespült und auf einem Agarblock so aufgereiht, dass die ventrale Seite mit dem ventralen Nervensystem nach oben zeigte. Danach wurde jeder Embryo einzeln an einem Dekonvolutiosmikroskop auf das Vorhandensein von markierten thorakalen GW-Neuronen hin analysiert, kategorisiert und anschließend einzeln auf kleinen Futterröhrchen bis zum gewünschten Stadium entwickeln gelassen. Sobald die Larve geschlüpft war, wurde sie entweder direkt präpariert (L1 Präparate) oder das Futterröhrchen wurde mit *Formular 4-24* Fertigmedium (*Carolina Biological Supply Company*) versetzt, um der Larve eine Entwicklung bis zum dritten Larvalstadium zu erlauben.

geschickt. Die Integration in das Genom erfolgte in die attP40 Insertionsstelle auf dem zweiten Chromosom. Die erhaltenen transgenen Fliegenmännchen wurden mit Jungfrauen des Stammes *y, v, cho/hs-hid; Sp/CyO* verkreuzt, wodurch in der folgenden Generation die das Transgen tragenden Fliegen anhand ihrer bräunlichen Augenfarbe erkannt werden konnten. Die auf diese Weise stabilisierten Transgenen konnten danach homozygotisiert oder für weitere genetische Kombinationen heran gezogen werden.

2.5.8 Ein modularer Modifier Screen zur Identifikation von Ubx-Interaktionspartnern

Um Protein-Interaktionspartner von Ubx zu identifizieren wurde ein modularer genetischer Modifier-Screen (Rørth, 1996; St Johnston, 2002) in Fliegenaugen in Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Vef durchgeführt. Hierbei wurde ein UAS-*Ubx^{la}*-Konstrukt zusammen mit einer Enhancer-Promotor-Linie (EP-Linien)(Rørth, 1996; Rørth et al., 1998) in dem sich entwickelnden Komplexauge mit *GMR*-Gal4 (Hay et al., 1997) exprimiert. *Ubx* wird als ein Hox Gen des Rumpfes unter normalen Bedingungen nicht im sich entwickelnden Augengewebe exprimiert. Die forcierte Expression von *Ubx* führt zu fehlentwickelten Augen, denen eine Pigmentierung fehlt. Weiterhin sind sie kleiner als wildtypische Augen und weisen unregelmäßige Borsten auf. Nach Co-Expression von *Ubx* und einem Kandidaten wurde auf Modifikationen des Phänotyps der alleinigen *Ubx* Expression hin analysiert.

Die Kandidaten wurden vorwiegend durch Verwendung von EP-Linien zur Expression gebracht. Während der Herstellung der EP-Linien wurde ein UAS-tragendes P-Element mit einem basalen Promotor (HSP70) im Fliegen genom mobilisiert und zufällig an anderen Stellen im Genom inserieren lassen (Rørth, 1996; Rørth et al., 1998). Dies führte zu einer ektopischen Transkription des benachbarten Gens nach Kreuzen mit einer Gal4-Linie und somit zu einer Bibliothek an Fliegen, die es erlaubt, einen Großteil des Fliegen genoms ektopisch zu aktivieren. Folgende Kreuzung wurde zum Test eines Kandidaten angesetzt:

$$F_0: \frac{w}{w}; \frac{GMR \text{ Gal4}}{GMR \text{ Gal4}}; \frac{UAS \text{ Ubx1a}}{TM6b \text{ Gal80}} \times \text{EP- oder UAS-Linie}$$

Die Verwendung des TM6b Gal80 Balancer-Chromosoms gestattete die stabile Haltung des Stammes. Gal80 ist hierbei ein Inhibitor von Gal4 und verhindert bei seiner Anwesenheit die durch Gal4 induzierte Expression von *Ubx*. Die Verwendung des Fliegenauges für die Untersuchung hatte den Vorteil, dass in der F₁-Generation zahlreiche Fliegen analysiert werden konnten und dass dies aufgrund der guten Sichtbarkeit des Fliegenauges ohne weitere präparative Schritte möglich war. Nach Kreuzung mit einer EP- oder einer UAS-Linie wurde in den Nachkommen das TM6b Gal80 Chromosom vom UAS-*Ubx^{la}* Chromosom separiert. In den das UAS-*Ubx^{la}* und den Kandidat in Kombination mit dem *GMR* Gal4 tragenden Individuen wurde die Morphologie der Augen analysiert:

$$F_1: \frac{w}{w \text{ (EP) oder } +}; \frac{GMR \text{ Gal4}}{(EP) \text{ oder } +}; \frac{UAS \text{ } Ubx^{la}}{(EP) \text{ oder } +}; \frac{+}{(EP) \text{ oder } +}$$

Da die EP-Insertionen oder die UAS-Linie auf jedem der vier Chromosomen vorkommen können, ist für die F1-Generation jeder potentiell mögliche Genotyp angegeben. Dabei befindet sich die EP-Linie aber jeweils nur auf einem der vier Chromosomen.

Durch die kombinierte Expression von *Ubx* mit einem Kandidaten konnte bei einer Interaktion zwischen *Ubx* und dem Kandidaten eine Modifikation der *Ubx*-Funktion erfolgen, welche sich in einer Veränderung des Augenphänotyps niederschlug (Verstärkung oder Abmilderung). Als Kontrolle wurde der Kandidat alleine mit *GMR* Gal4 exprimiert, was zu keinem oder zumindest zu einem entgegengesetzten Phänotyp führen sollte. Die Einschätzung des Phänotyps wurde durch Dr. Olaf Vef vorgenommen. Meine Unterstützung dieses Prozesses lag beim Sammeln der in großen Mengen benötigten jungfräulichen Fliegen, dem Ansetzen der zahlreichen Kreuzungen und bei der theoretischen Zuarbeit von potentiellen Kandidaten, die im Zuge der Literaturrecherche aufkamen. Diese Linien umfasste vornehmlich UAS Linien.

2.6 Immunohistochemie

2.6.1 Gewinnung von Embryonen

Um Embryonen für immunohistochemische Verfahren zu gewinnen, wurden die gekreuzten Fliegen auf großen Röhren für drei Tage mit Trockenhefe angefüttert. In

dieser Zeitspanne erfolgte die Paarung und Produktion der Eier. Danach wurden die Fliegen auf Gefäße mit Apfelsaftagar transferiert. Zur Stimulation der Eiablage wurde auf den Apfelsaftagar etwas Trockenhefe gestreut. Für die meisten Experimente wurden Embryonen im sehr späten Stadium 16/ frühen Stadium 17 benötigt (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Hierfür wurden den Embryonen 20 h gewährt, was eine Entwicklung bis zum Schlupf der L1 Larve erlaubt. Für die Flybow Experimente wurden zweistündige Ablagen gewählt (siehe Kapitel 2.7.6).

Apfelsaft-Agar

28 g Agar-Agar in 1 l handelsüblichem Apfelsaft aufkochen und Aufzuchtgefäße (50 mm) unverzüglich etwa 0,5 – 1 cm hoch füllen.

Lagerung bei 4 °C.

2.6.2 Chemische Dechorionisierung von Embryonen

Das Ei von *Drosophila* zeichnet sich durch zwei schützende Eihüllen aus, welche als Chorion und Vitellinmembran bezeichnet werden. Das Chorion wurde in dieser Arbeit chemisch mittels 7,5 %iger Natriumhypochlorit - Lösung (NaClO) entfernt, in dem das Apfelsaftagarablagegefäß damit für 2 min überschichtet wurde. Die Embryonen wurden anschließend in ein halbiertes 50 ml Falcon gegossen, welches an der Unterseite mit Nylongaze verschlossen war und somit als Sieb wirkte. Die verbleibende NaClO-Lösung wurde durch Spülen mit etwa 1 l frischem Wasser entfernt. Von dem Nylonnetz wurden die Embryonen dann mit einem Spatel in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß für die Fixierung überführt.

2.6.3 Chemische Fixierung

Embryonen

Dechorionisierte Embryonen wurden in Fixativ für 22 min auf einem Schüttler unter starkem Schütteln fixiert. Anschließend wurde die untere Phase gegen 500 µl Methanol ausgetauscht und das Reaktionsgefäß auf einem Vortexmischer für circa eine Minute stark geschüttelt, wodurch die Vitellinmembran riss. Die devitellinisierten Embryonen sanken im Anschluss auf den Grund. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Nach den beiden Devitellinisierungsschritten ließ man die Embryonen zu Boden sinken, nahm die komplette Flüssigkeit ab und ersetzte sie durch Methanol. Dieser Waschschrift wurde

viermal wiederholt um Reste des Fixativs zu entfernen. Im Anschluss wurden die Embryonen entweder in Ethanol bei -20 °C gelagert oder direkt mit ihnen weitergearbeitet.

Fixativ

430 µl	1x PBS
70 µl	Formaldehyd (37 %)
600µl	Heptan

PBS (20x)

1,3 M	NaCl
0,07 M	Na ₂ HPO ₄
0,03 M	NaH ₂ PO ₄

in Aqua dest., pH 7,4 einstellen und autoklavieren. Vor Gebrauch 1:20 in Aqua dest. verdünnen.

Larven

Für die Analyse der GW-Projektionsmuster wurden sowohl L1 als auch L3 Larven nach Induktion von Flybow-Klonen präpariert, fixiert und mit Antikörpern gefärbt.

L1 Larven wurden in eisgekühltem PBS betäubt und anschließend mit feinen Pinzetten auf Eis in 1x PBS mittig auseinandergerissen, ohne das zentrale Nervensystem (ZNS) zu verletzen. Dann wurde jede Larve einzeln mit einer feinen Insektennadel in einer kleinen, mit Silikon gefüllten Petrischale aufgepinnt und markiert, sodass eine Zuordnung zur embryonalen Katalogisierung möglich war. In einem Tropfen PLP-Fixativ wurden die Gehirne dann für eine halbe Stunde im Dunkeln in einer Feuchtekammer fixiert. Danach wurden sie mehrmals mit PBT gespült und mit Antikörpern gefärbt.

L3 Larven wurden zunächst auf Eis betäubt und dann mit Insektennadeln in kaltem PBS an den Mundwerkzeugen und im hinteren Körperviertel auf Silikonschälchen fest gepinnt. Dann wurde unter Verwendung einer chirurgischen Schere (*Fine Science Tools*) die Cuticula an der dorsalen Mittellinie vorsichtig geöffnet. Mit weiteren Nadeln wurde die Larve ausgebreitet und die inneren Organe vorsichtig entfernt. Hierbei musste mit großer Vorsicht vorgegangen werden, um nicht das Nervensystem oder die somatischen Muskeln zu verletzen. Die so präparierte Larve wurde für 45 min im Dunkeln in PLP-Fixativ fixiert. Nach der Fixierung wurde die Larve in ein 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit PBT überführt und mit Antikörpern inkubiert.

Natriumphosphatpuffer (0,1 M)

500 ml 0,1 M Na₂HPO₄ mit 0,1 M NaH₂PO₄ auffüllen bis pH 7,4

Paraformaldehyd (PFA, 0,8 %)

1,6 g PFA in 20 ml destilliertem Wasser und 140 µl 1M NaOH bei 37 °C lösen,
aliquotieren und bei -20 °C lagern

PBL

1,8 g Lysin-HCL
0,1 M Na₂PO₄ zugeben und bis pH 7,4
mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer auf 100 ml auffüllen
bei 4 °C etwa 3 Monate haltbar

PLP-Fixativ

3 Vol. PBL
1 Vol. PFA (8 %) (vor Nutzung erwärmen und vollständig lösen)

PBT

0,3 % Triton-X100 (v/v) in PBS

2.6.4 mRNA *in situ* Hybridisierung

Mit einer *in situ* Hybridisierung können Nukleinsäuren in Geweben (*in situ*) nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden sowohl sichtbare (eine durch alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion) als auch fluoreszente (eine durch Meerrettichperoxidase katalysierte fluoreszente Farbreaktion) *in situ* Hybridisierungen genutzt um Genexpressionsmuster zu visualisieren. Hierfür wurden einzelsträngige *antisense* RNA-Sonden (Tabelle 22) verwendet, welche nach der Denaturierung aller Nukleinsäuren während der Renaturierung sehr spezifisch an komplementäre mRNA-Sequenzen innerhalb der Zellen hybridisieren. Die Spezifität beruht dabei auf der Länge der Sonde. Bei der Synthese der Sonde wurde neben den normalen Nukleotiden außerdem Digoxigenin (DIG) markiertes Uridintriphosphat (UTP) verwendet. Bei Digoxigenin handelt es sich um ein pflanzliches Steroid des Roten Fingerhutes (*Digitalis purpurea*), welches lediglich in an UTP gebundener Form von einem anti-DIG-

Antikörper sehr spezifisch erkannt werden kann. Der Antikörper war für die sichtbare *in situ* Hybridisierung mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, für die fluoreszente mit einer Meerrettich - Peroxidase (POD), die eine Farbreaktion katalysierten. Die alkalische Phosphatase katalysiert dabei eine Farbreaktion von 4-nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) mit 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-Phosphat (BCIP), welche einen bläulichen Farbniederschlag generiert. Bei der durch die Peroxidase katalysierten Farbreaktion wurde Cyanin-gekoppeltes Tyramid in ein fluoreszentes Präzipitat umgesetzt.

RNAs sind sehr anfällig für Degradationen mit ubiquitär vorhandenen Ribonukleasen (RNasen). Daher wurden alle Lösungen für die Arbeiten mit RNA mittels Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung RNase-frei hergestellt. Hierfür wurden zu den Lösungen 0,1 % DEPC hinzugefügt, für mindestens 12 h inkubiert und danach autoklaviert. Zusätzlich wurden gestopfte Pipettenspitzen und Handschuhe verwendet und der Arbeitsplatz regelmäßig mit 70 % Ethanol gereinigt.

Tabelle 22: Verwendete Sonden

Name	Verdünnung	Herkunft/Vorlage
<i>a2bp1</i>	1:1000	diese Arbeit/ AT24801
<i>arm</i>	1:1000	diese Arbeit/ LD23131
<i>C3G</i>	1:500	Diese Arbeit/ RE10624
<i>CG11873</i>	1:500	diese Arbeit/PCR
<i>CG42671</i>	1:500	diese Arbeit/PCR
<i>dbr</i>	1:500	diese Arbeit/ GH08783
<i>Dsulf1</i>	1:1000	Primer von David Jussen/PCR
<i>faf</i>	1:2000	diese Arbeit/ LD22582
<i>netB</i>	1:1000	diese Arbeit/ PCR
<i>SRPK</i>	1:1000	diese Arbeit/ SD03158
<i>tara</i>	1:1000	diese Arbeit/ RE12330
<i>Wnt4</i>	1:1000	David Jussen
<i>yps</i>	1:1000	diese Arbeit/ GH18372

Beseitigung von Autofluoreszenz

Um Autofluoreszenzen der Embryonen während der fluoreszenten *in situ* Hybridisierung zu beseitigen, wurden die Embryonen zunächst in 10 %iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂, in Methanol) für 20 min auf einem Tischschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde das H₂O₂ herunter gewaschen, indem die Lösung durch

PBTween (DEPC) ausgetauscht und im Anschluss viermal 10 min gewaschen wurde. Für die sichtbare *in situ* Hybridisierung entfiel der Wasserstoffperoxidschritt und die Embryonen wurden direkt vom Methanol in PBTween (DEPC) überführt und viermal 10 min gewaschen. Um die Embryonen auf die Prähybridisierung vorzubereiten, wurden sie zunächst in einem Gemisch aus PBTween (DEPC) und Hybridisierungslösung im Verhältnis 1:1 für 10 min gewaschen. Danach wurde das Gemisch durch reine Hybridisierungslösung ersetzt und erneut für 10 min gewaschen.

dH₂O (DEPC)1 l dH₂O

1 ml DEPC

min 12h unter einem Abzug inkubieren, dann autoklavieren

Hybridisierungslösung

50 % Formamid

25 % 20x SSC (DEPC)

25 % dH₂O (DEPC)

0,01 % Tween-20 (v/v)

PBTween (DEPC)

0,01 % Tween-20 (v/v) in PBS (DEPC)

Prähybridisierung

Der Prähybridisierungsschritt dient dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen von Nukleinsäuren innerhalb der Zellen durch Inkubation mit einer DNA-Lösung. Hierfür wurden 500 µl Hybridisierungslösung mit 5 µl *Salmon Sperm DNA* (ssDNA, 10 mg/10 µl, Roche) gemischt. Damit die ssDNA an unspezifische Nukleinsäurebindungsstellen binden konnte, wurde sie zunächst für 5 min bei 100 °C denaturiert. Dadurch lag die DNA einzelsträngig vor und konnte während des Abkühlens an die unspezifischen Bindungsstellen hybridisieren. In dieser DNA-Lösung wurden die Embryonen für mindestens 1,5 h inkubiert.

Hybridisierung

Für die Inkubation wurden die Sonden (verdünnt in Hybridisierungslösung mit 1% ssDNA) zunächst für 5 min bei 100 °C denaturiert, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und dann zu den Embryonen gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte für mindestens 16 h bei 55 °C. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgenommen. Ungebundene Sonde wurde durch Waschschrte von 30 min bei 65 °C in Hybridisierungslösung entfernt und dann in einem 1:1-Gemisch aus Hybridisierungslösung und PBTween (DEPC). Darauf folgten vier Waschschrte für 20 min bei 65 °C in PBTween (DEPC).

Nachweis der Sonde bei der sichtbaren *in situ* Hybridisierung

Die Sonde konnte nach der Hybridisierung durch ihre Markierung mit DIG-gekoppelten Nukleotiden mit einem anti-DIG-Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Embryonen zunächst einmal für 10 min bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem *anti-DIG AP*-Antikörper (Roche, 1:1000 in PBTween) für 1,5 h. Danach wurde dreimal mit PBTween gespült und dreimal für 10 min gewaschen. Danach folgten zwei Waschschrte für je 5 min in Detektionspuffer bei RT. Für die Farbreaktion wurden pro Milliliter Detektionspuffer 3 µl NBT, sowie 1,5 µl BCIP gemischt und zu den Embryonen gegeben. Für die Beobachtung der Farbreaktion wurden die Embryonen in weiße Wägeschälchen überführt. Die Stärke der Farbreaktion wurde unter einem Binokular verfolgt und bei Erreichen einer geeigneten Farbtintensität durch dreimaliges Waschen in PBTween und einem zehnminütigen Waschschrte in Methanol gestoppt. Zur vollständigen Entfernung des Methanols wurden die Embryonen zuletzt dreimal für 10 min mit PBTween gewaschen. Danach erfolgte entweder eine Antikörperfärbung oder sie wurden in 70 %igem Glycerin bis zur Analyse gelagert.

Detektionspuffer

1 ml	5M NaCl
2,5 ml	1M MgCl ₂
5 ml	1M Tris pH 9.5
50 µl	Tween 20
41.5 ml dH ₂ O.	

Nachweis der Sonde bei der fluoreszenten *in situ* Hybridisierung

Die Embryonen wurden zunächst in TNB-Puffer für 30 min inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Embryonen mit dem *anti-DIG-POD*-Antikörper (Roche) in einer Verdünnung von 1:500 für 2 h bei RT inkubiert. Um überschüssigen Antikörper nach dieser Inkubation zu entfernen, wurden die Embryonen viermal für 10 min in PBTween und anschließend zwei Mal für 5 min in TNT-Puffer gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 98 µl *amplification diluent* mit 2 µl Thyramid-Cy3-Lösung gemischt und die Embryonen in dieser Lösung für maximal 10 min inkubiert. Danach erfolgten ein Spülschritt und drei Waschschrte für 10 min in TNT-Puffer. An dieser Stelle konnte der Erfolg der Reaktion unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden. Es wurde anschließend mit einer Antikörperfärbung fortgefahren.

TNB-Puffer

0,1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
0,15 M	NaCl
0,5 %	<i>blocking reagent</i> (Perkin&Elmer)

dH₂O unter Erhitzen lösen und gegeben falls filtrieren.

TNT-Puffer

0,1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
0,15 M	NaCl
0,05 %	Tween 20

in dH₂O.

2.6.5 Fluoreszente Antikörperfärbungen

Die Embryonen oder Larven wurden in PBT überführt und in diesem in vier Waschschrten (10 min unter Schütteln) für die Antikörperbehandlung vorbereitet. Der primäre Antikörper wurde in 100 - 400 µl entsprechend der empfohlenen Konzentration in Antikörper-Stammlösung oder PBT verdünnt (siehe Tabelle 5) und in dieser Lösung für 16 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Es wurden sowohl sequentielle Einzelfärbungen durchgeführt, bei der nacheinander eine Inkubation in einer primären Antikörperlösung mit nur einem primären Antikörper inkubiert wurden, oder es wurden die primären Antikörper gemischt und in einem Schritt inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen für 10 min in PBT entfernt. Danach

erfolgte die Inkubation in PBT, welches die sekundären Antikörper der entsprechenden Spezies und Farbstoffkopplung in einer Verdünnung von 1:500 enthielt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wurde durch viermaliges Waschen für 10 min in PBT entfernt. Nach diesem Schritt wurden die Embryonen für 10 min in PBS gewaschen und in 500 µl 70 % Glycerin (in PBS) überführt.

PBS (20x)

1,3 M	NaCl
0,07 M	Na ₂ HPO ₄
0,03 M	NaH ₂ PO ₄

in Aqua dest. bzw. DEPC-H₂O (für Lösungen, die für *in situ*-Hybridisierungen verwendet werden), autoklavieren. Vor Gebrauch 1:20 in Aqua dest. verdünnen, pH 7,4 einstellen.

PBT

0,3% Triton-X100 (v/v) in PBS

2.7 Anfertigung mikroskopischer Präparate

Filetpräparation von Embryonen

Um für die mikroskopischen Analysen eine reproduzierbare und vergleichbare Sicht auf das ZNS mit peripheren Nerven und somatischer Muskulatur zu erhalten, wurden Filetpräparationen erstellt. Die Embryonen lagen nach den Färbungen (*in situ* Hybridisierung und Antikörperfärbung) in 70 % Glycerin vor. In diesem wurden sie auf einem Objektträger an einem Fluoreszenzmikroskop ihrem Genotyp entsprechend selektiert und dann unter einem Binokular mit Präparationsnadeln präpariert. Präpariert wurden Stadien 14-17. Zunächst wurde die Epidermis an der dorsalen Mittellinie geöffnet und der Darm, die Speicheldrüsen und die Gehirnhemisphären entfernt. Die so erhaltene Hülle aus ZNS mit Haut-Muskelschlauch wurde auf einen neuen Objektträger mit 70 %igem Glycerin überführt und dort auf der Glasfläche ausgebreitet. Die so präparierten Embryonen wurden mit einem Deckglas, welches Plastilin an seinen Ecken als Abstandhalter besaß, vorsichtig bedeckt. Danach wurden die Knetecken vorsichtig angedrückt und das Deckglas mit Glycerin aufgefüllt. Zuletzt erfolgte eine Versiegelung der Präparate mit klarem Nagellack und eine Lagerung bei -20 °C im Dunkeln.

Whole mount Präparate wurden angefertigt, indem ein Tropfen mit Embryonen in 70 %igem Glycerin auf einen Objektträger überführt wurde und mit einem mit Abstandshaltern aus Plastilin versehenen Objektdeckel bedeckt wurde. Die Versiegelung erfolgte mit klarem Nagellack. Die Lagerung erfolgte bei RT im Dunkeln.

Anfertigung von larvalen Präparaten

L1 Gehirne wurden nach der Antikörperfärbung mit feinen Präparationsnadeln auf einem Objektträgern in einem Tropfen 70 %igem Glycerin frei präpariert und mit der Ventralseite nach oben positioniert. Danach wurden sie unter einem Objektdeckel mit Plastilin als Abstandshalter bedeckt und mit klarem Nagellack versiegelt.

L3 Präparate wurden in 70 %igem Glycerin positioniert, mit Objektdeckel Plastilin als Abstandshalter bedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -20 °C im Dunkeln.

2.8 Dokumentation der Färbungen

Die Dokumentation der fluoreszenten Präparate erfolgte an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Verwendet wurde das Modell TSC SP5 der Firma Leica. Die *in vivo* Analysen für die Einzelzellmarkierung mit Flybow erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop DM4 B (Leica). Die gewonnen sichtbaren *in situ* Hybridisierungen wurden an einem Mikroskop Axioplan (Zeiss) dokumentiert.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit FIJI und Adobe Photoshop CS4 bearbeitet und mit Adobe Illustrator in Bildtafeln zusammengestellt.

3 Ergebnisse

Bereits in mehreren Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass *Hox*-Gene eine Rolle auf die Entwicklung und Differenzierung neuronaler Schaltkreise spielen (Philippidou and Dasen, 2013). Insbesondere der Einfluss auf das Körperregion-spezifische Motoneuronmuster war und ist Gegenstand intensiver Forschung (Dasen et al., 2003; Dasen et al., 2005; Dixit et al., 2008; Friedrich et al., 2016). Dennoch bleiben viele Fragen bezüglich der *Hox*-Funktion innerhalb dieser Netzwerke weiterhin offen. Diese umfassen unter anderem die räumliche und zeitliche Regulation *Hox*-kontrollierter Gene sowie die Spezifität der *Hox*-Funktion durch Interaktion mit anderen Proteinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Rolle des *Hox*-Gens *Ubx* während der Etablierung neuro-motorischer Netzwerke in der späten Entwicklungsphase von *D. melanogaster* analysiert und funktionelle Mechanismen untersucht. Hierbei wurden drei miteinander verknüpfte Kernaspekte beleuchtet:

- (1) Die Identifikation neuronaler *Ubx* Protein-Interaktionspartnern mittels eines genetischen *Modifier*-Screens, sowie die Verifizierung der Interaktion in einem Zellkulturmodell (in Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Vef, Kapitel 3.1)
- (2) Die Analyse der *Ubx*-Funktion in Muskeln und Neuronen im Hinblick auf die Generierung neuromuskulärer Netzwerke mit Fokus auf die Kommunikation zwischen diesen Geweben (Kapitel 3.2)
- (3) Die Untersuchung der *Ubx*-Funktion während der Differenzierung neuronaler Netzwerke durch programmierten Zelltod am Beispiel des GW-Neurons (Kapitel 3.3)

3.1 Identifikation potentieller *Ubx* Protein-Interaktionspartner

Die Strategie zur Identifikation neuer Protein-Interaktionspartner von *Ubx* ist in der folgenden Abbildung dargestellt (siehe **Abbildung 5**). Potentielle Kandidaten wurden durch unterschiedliche Analysemethoden stufenweise eingegrenzt.

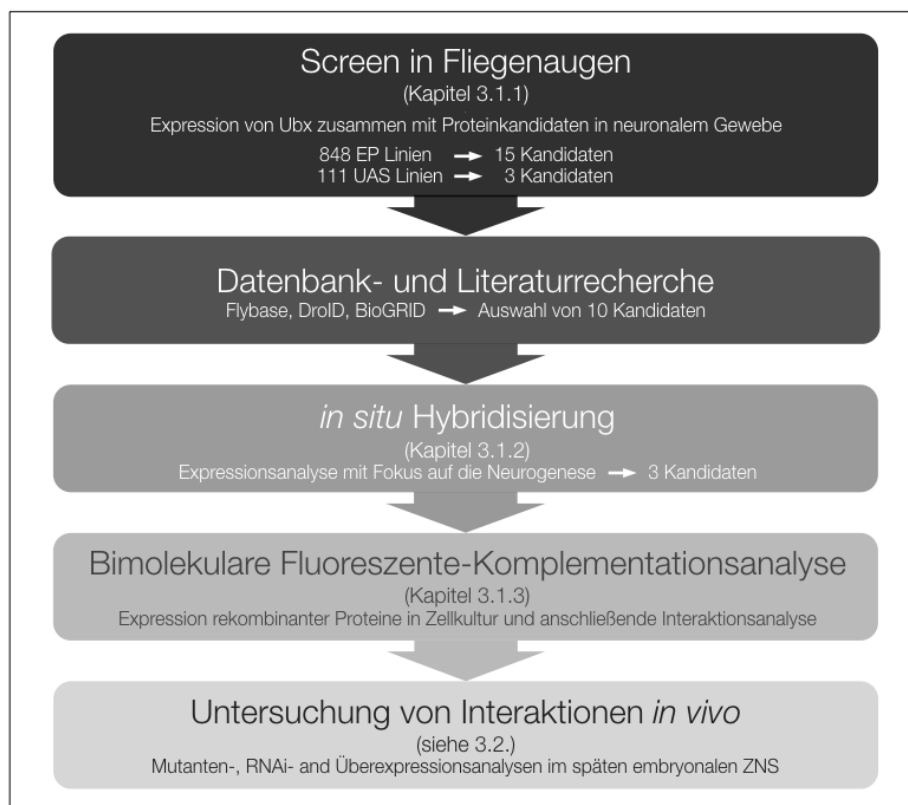


Abbildung 5: Identifikation neuer Protein-Interaktionspartner des Hox-Proteins Ubx.

Überblick über die der Auswahl zugrunde liegende Strategie. Mit Hilfe eines genetischen *Modifier*-Screens in Fliegenaugen wurden 18 potentielle Interaktionspartner identifiziert, welche durch eine Kombination aus Datenbank- und Literaturrecherche, sowie Expressionsanalysen eingegrenzt wurden. Nach Anwendung dieses Kriterienspektrums wurden die drei vielversprechendsten Kandidaten ausgewählt und in Zellkultur, sowie während der embryonalen Neurogenese im Hinblick auf ihre Interaktion mit Ubx analysiert.

3.1.1 Der genetische *Modifier*-Screen in Fliegenaugen

Um Protein-Interaktionspartner von Ubx zu identifizieren wurde ein modularer genetischer *Modifier*-Screen (Rørth, 1996; St Johnston, 2002) in Fliegenaugen in Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Vef durchgeführt. Hierbei wurde Ubx parallel mit unterschiedlichen Kandidaten im Komplexauge exprimiert und auf Modifikationen des Phänotyps hin analysiert. Mit dieser Vorgehensweise konnten insgesamt 959 Kreuzungen analysiert und 18 potentiellen Interaktionspartnern identifiziert werden (**Tabelle 23**). Um aus diesen Kandidaten die interessantesten auswählen zu können wurde mit www.Flybase.org das potentielle Gen ermittelt, welches durch die EP-Linie ektopisch aktiviert wurde. Weiterhin konnte dort über die Literaturangaben in den meisten Fällen eine erste Einschätzung der Gen-Funktion vorgenommen werden.

Ubx ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in vielen unterschiedlichen Zelltypen zu unterschiedlichen Zeiten aktiv ist und zell-spezifische Entwicklungsprogramme vermittelt (Akam, 1998). Dementsprechend enthielt die Liste der potentiellen Interaktionspartner eine große Anzahl an Kandidaten, welche direkt oder indirekt mit transkriptionellen Prozessen in Verbindung stehen (7 von 18, **Tabelle 23**) (Bondos et al., 2006; Hsiao et al., 2014). Ferner standen 5 von 18 Kandidaten in Zusammenhang mit der Kategorie „Signaltransduktion“. Zwei weitere Kandidaten konnten Ubiquitin-assoziierten Prozessen zugeordnet werden (*debra (dbr)* und *fat facets (faf)*). Weiterhin waren einige Kandidaten dabei, von denen sehr wenig bekannt ist (*CG11873*, *CG1910* und *CG42671*).

Tabelle 23: Der Modifier-Screen in Fliegenaugen liefert 18 Kandidaten.

Kandidat	Flybase ID	Kategorie	Molekulare Funktion (Gen Ontologie Begriffe)	ausgesuchte biologische Prozesse
<i>A2bp1</i>	FBgn0052062	Transkription, RNA Bindung	Transkriptionsfaktor Bindung; Bindung regulatorischer DNA Bereiche	Nervensystementwicklung; Flügelvenenspezifikation; Oogenese; positive Regulation von Transkription, DNA-abhängig
<i>arm</i>	FBgn0000117	Transkription, Zell-Adhäsion, Signaltransduktion	Cadherin Bindung, Proteinkinase Bindung; Proteinbindung; RNA Polymerase II; Transkription Co-Aktivatoraktivität; Alpha-Catenin Bindung; Zytoskelett; Strukturmolekül	Langzeitgedächtnisbildung; Nervensystementwicklung; Neuroblastenspezifizierung; Wnt Signaltransduktion; Zelladhäsion, Zonula Adherens; Zellschicksalsdetermination; Zellmorphogenese; Morphogenese des Facettenauges; Programmierter Zelltod in der Retina; Photorezeptordifferenzierung; positive Regulation der Transkription der RNA polymerase II Promotoren; Regulation der Zellform; somatische Stammzellerhaltung;
<i>C3G</i>	FBgn0259228	Signaltransduktion	Ras Guanyl-Nukleotid-Austauschfaktoraktivität	Ras vermittelte Signaltransduktion; somatische Muskelentwicklung; Sarcomerorganisation; Muskelbefestigung; Regulation der Rap GTPase Aktivität
<i>CG11873</i>	FBgn0039633	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<i>CG1910</i>	FBgn0039633	unbekannt	unbekannt	Langzeitgedächtnisbildung
<i>CG42671</i>	FBgn0261553	unbekannt	unbekannt	Mesothorakales Tergum
<i>ci</i>	FBgn0004859	Transkription, Signaltransduktion	RNA Polymerase II regulatorische, sequenzspezifische DNA Bindung; Proteinbindung;	Hedgehog Signaltransduktion; Entwicklungsprozesse; Regionalisierung; neuronale Differenzierung; Entwicklung der Sensorik;
<i>dCrebA</i>	FBgn0004396	Transkription	DNA Bindung, enhancervermittelte sequenzspezifische DNA -Bindung	Dorso-ventrale Musterbildung; Entwicklung der embryonalen und larvalen Chitinhülle; positive Regulation der Transkription der RNA Polymerase II Promotoren; Speicheldrüsenentwicklung
<i>dbr</i>	FBgn0067779	Ubiquitin assoziierte Prozesse	Zinkionbindung	Langzeitgedächtnisbildung; Nukleäres Gen
<i>Egfr</i>	FBgn0003731	Signaltransduktion	Proteinbindung	Entwicklung des Sensorischen Nervensystems; Post-embryonale Morphogenese; Regulation von Entwicklungsprozessen; Entwicklung des Verdauungstraktes; Zellschicksalsdetermination; Entwicklung des Tracheensystems
<i>faf</i>	FBgn0005632	Ubiquitin assoziierte Prozesse	Proteinbindung; Ubiquitin assoziierte Prozessspezifische Proteaseaktivität	Protein De-Ubiquitinierung; Komplexaugenentwicklung; Dorso-ventrale Achsenspezifizierung; Embryonalentwicklung; Zellularisierung; Ubiquitin assoziierte Prozesse
<i>Phf7</i>	FBti0033208	Transkription	Histonbindung; Zinkionbindung	Geschlechtsdetermination der männlichen Keimbahn

<i>psa</i>	FBgn0261243	Proteolyse	Aminopeptidaseaktivität; Metallopeptidaseaktivität; Zinkionbindung	Proteolyse
<i>repo</i>	FBgn0011701	Transkription	RNA Polymerase II regulatorische, sequenzspezifische DNA Bindung;	Positive Regulation von Genexpression; Entwicklung von Gliazellen; Nervensystementwicklung; Entwicklung des peripheren Nervensystems
<i>rho-4</i>	FBgn0030318	Signaltransduktion	Peptidaseaktivität vom Serin-Typ; Kalziumion-Binding	Proteolyse
<i>srpk</i>	FBgn0026370	Phosphorylierung	ATP Bindung; Proteinkinaseaktivität	Karyosombildung; Spindelanordnung während der weiblichen Meiose, Phosphorylierung, Nukleäres Gen
<i>tara</i>	FBgn0040071	Transkription	unbekannt	Chromatin-vermittelte Erhaltung der Transkription; laterale Inhibition; Trithorax; Zellzyklusentwicklung; Lokomotionsrhythmus; Schlaf
<i>yps</i>	FBgn0022959	RNA Bindung	DNA-Bindung; RNA-Bindung;	mRNA Splicing via Spliceosome; Oogenese; Regulation der Transkription

3.1.2 *in situ* Expressionsanalysen potentieller Interaktionspartner von Ubx

Aus der in **Tabelle 23** gezeigten Kandidatenliste wurden nach der Literatur- und Datenbankrecherche 10 Kandidaten ausgewählt und deren zeitliche und räumliche Expression mit *in situ* Hybridisierungen analysiert. *Ubx* wird ab dem Stadium 14 spezifisch in Neuronen hochreguliert (Geyer et al., 2015; White and Wilcox, 1985). Ein potentieller neuronaler Interaktionskandidat sollte daher während dieser Phase im ZNS exprimiert werden. Besonderes Augenmerk lag daher auf einer Expression in mittleren bis späten Entwicklungsstadien. In Stadium 11 findet die letzte Phase der Neuroblastenspezifizierung statt. In diesem Stadium wurde *Ataxin 2-binding protein 1* (*A2bp1*), *taranis* (*tara*), *ypsilon schachtel* (*yps*) und *armadillo* (*arm*) im sich entwickelnden ZNS exprimiert (**Abbildung 6**). Während des Stadium 14 beginnt die Differenzierung der entstandenen Neurone und die ersten Motoneurone entsenden Axone in die Peripherie und beginnen damit, ihre entsprechenden Zielmuskeln zu suchen (Broadie et al., 1993; Prokop, 1999; Sink and Whittington, 1991). *A2bp1*, *tara*, *faf*, *CG11873*, *SR Protein Kinase (SRPK)*, *CG42671*, *yps* und *arm*, welche in diesem Stadium im ZNS exprimiert werden, könnten einen Einfluss während des Differenzierungsprozesses ausüben (**Abbildung 6**). In der späten Phase der Embryogenese (Stadium 16 und 17) werden unter anderem die Neuromuskulären Kontakte ausgebildet und gefestigt (Broadie et al., 1993; Peraanu et al., 2007; Prokop, 1999; Sink and Whittington, 1991). Kandidaten, welche in diesem Stadium in neuronalem Gewebe exprimiert wurden, waren *a2bp1*, *tara*, *faf*, *CG11873*, *SRPK*, *CG42671*, *yps* und *arm* (**Abbildung 6**). 20 % der untersuchten Kandidaten wiesen eine ubiquitäre Expression auf (*yps* und *arm*). *C3G* und *dbr* zeigten keine oder wenig Expression im embryonalen ZNS.

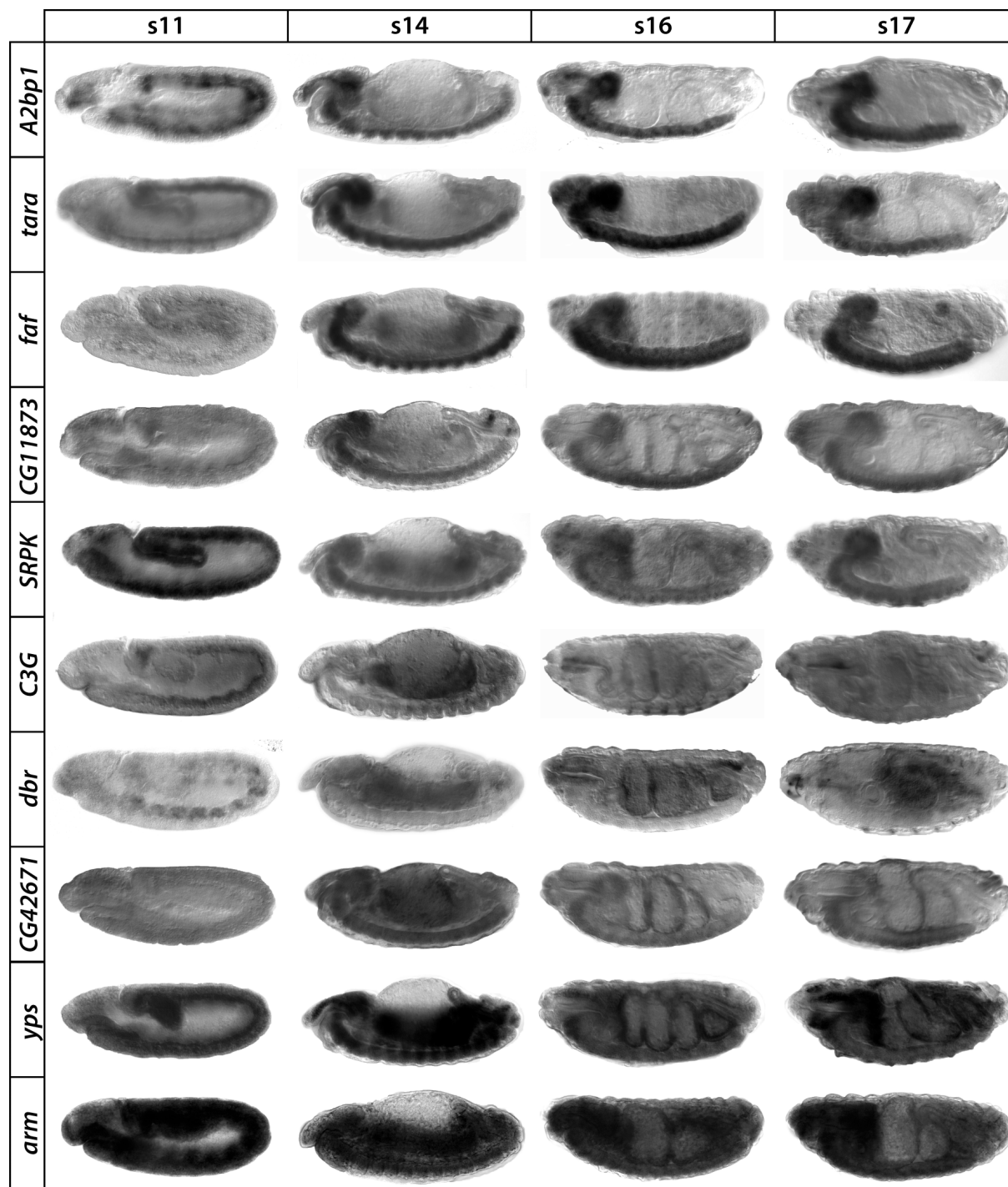


Abbildung 6: Expressionsanalyse ausgewählter Kandidaten.

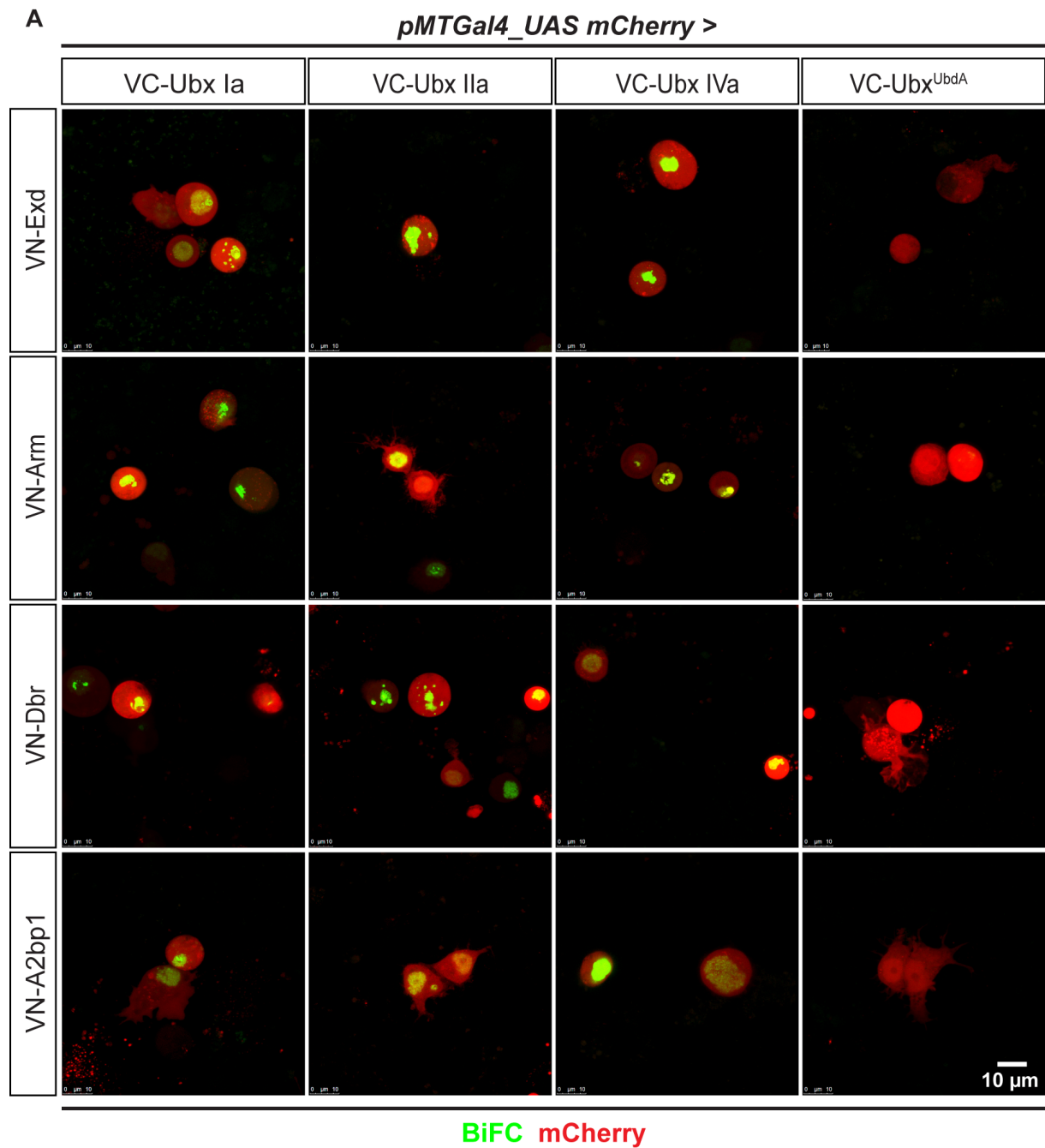
Gezeigt sind *in situ* Hybridisierungen ausgewählter Kandidaten in mittleren bis späten embryonalen Entwicklungsstadien. Der Großteil der Kandidaten zeigt eine ZNS-spezifische Expression (*A2bp1*, *tara*, *faf*, *CG11873*, *SRPK* und *CG43671*). *C3G* und *dbr* zeigen nur wenig bis keine Expression innerhalb des ZNS. Zwei Kandidaten zeigen eine ubiquitäre Expression, die das sich entwickelnde ZNS umfasst (*yps* und *arm*).

3.1.3 Visualisierung von Ubx-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen mit der Bimolekularen-Fluoreszenten-Komplementation (BiFC)

Basierend auf den erhaltenen Informationen über die Kandidaten wurden Arm, Dbr und A2bp1 gewählt, um direkte Protein-Interaktionen mit Ubx zu untersuchen. Arm wurde aufgrund seiner vielfältigen Rolle in diversen Entwicklungsprozessen und seiner Beteiligung im evolutionär konservierten Wnt-Signalweg ausgesucht (Cox et al., 1999; Loureiro and Peifer, 1998; Pai et al., 1997; Valenta et al., 2012). Weiterhin wurden bereits genetische und direkte Interaktionen mit Ubx gezeigt (Bondos et al., 2006; Hsiao et al., 2014). Auch wurde Arm in einem unabhängigen Yeast-Two-Hybrid Screen innerhalb des Labors gefunden (durchgeführt von Dr. Ana Rogulja-Ortmann, nicht publiziert), wodurch die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Interaktion mit Ubx erhöht war. Als zweiter Kandidat wurde Dbr ausgewählt. Obwohl dieser keine eindeutige Expression innerhalb des embryonalen ZNS aufwies, war hier insbesondere von Interesse, wie Dbr, als ein polyubiquitinierendes Enzym, Interaktionen mit Ubx eingeht. Des Weiteren sind Dbr und *Cubitus interruptus* (Ci), welches ebenfalls Kandidat in dem Screen war (**Tabelle 23**), über den evolutionär konservierten Hedgehog-Signalweg assoziiert (Dai et al., 2003). Zuletzt wurde A2bp1 gewählt, da es eine klare ZNS spezifische Expression aufwies und mit der Nervensystementwicklung in Verbindung gebracht wird (Koizumi et al., 2007). A2bp1 zeichnet sich außerdem durch seine regulatorische Wirkung auf transkriptionelle Prozesse aus und ist als ein mRNA bindendes Protein beschrieben (Lasko, 2000). Auch wurde bereits eine direkte Protein-Interaktion mit Ci gezeigt. Interessanterweise wurde außerdem beschrieben, dass A2bp1 in der Imaginalscheibe der Haltere durch Ubx negativ reguliert wird (Bajpai et al., 2004).

Der Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations Assay (BiFC) stellt eine Möglichkeit dar, Protein-Protein Interaktionen in lebenden Zellen zu detektieren (Kerppola, 2006). In dieser Arbeit wurde das fluoreszierende Protein Venus verwendet. Die Orientierung der Fusion wurde so gewählt, dass Ubx immer mit der C-terminalen Hälfte von Venus (VC) fusioniert wurde. Die Interaktionskandidaten wurden immer mit dem N-terminalen Abschnitt von Venus (VN) fusioniert. BiFC hat sich in dieser Anordnung in vorherigen Studien als sehr erfolgreich erwiesen um Protein-Protein-Interaktionen von Hox-Proteinen zu untersuchen (Baëza et al., 2015; Bridoux et al., 2015; Hudry et al., 2011; Hudry et al., 2012; Lambert et al., 2012).

Für das Zellkultursystem wurde der pMT_Gal4-Plasmid (Klueg et al., 2002) durch die Einbringung einer UAS-*mCherry* Kasette so modifiziert, dass er sowohl zum Treiben der BiFC Fusionsproteine (mittels Gal4), als auch als Transfektionskontrolle (UAS-*mCherry*) diente. Dadurch konnten transfizierte Zellen anhand der *mCherry*-Expression in automatisierter Weise gezählt und die BiFC-Fluoreszenz analysiert werden. Als Positivkontrolle wurde die gut charakterisierte Interaktion zwischen Ubx und Exd verwendet (**Abbildung 7**) (Chan et al., 1994; Hudry et al., 2011; Hudry et al., 2012). Als Negativkontrolle wurde die starke Reduktion der Ubx-Exd-Interaktion durch die Mutation der UbdA Domäne von Ubx genutzt (**Abbildung 7**) (Hudry et al., 2011; Merabet et al., 2007). In dieser Testreihe wurden die drei hauptsächlichlichen Ubx-Splice-Isoformen UbxIa, UbxIIa und UbxIVa untersucht (Geyer et al., 2015; Hatton et al., 1998; Kornfeld et al., 1989; Subramaniam et al., 1994). Von Interesse war, ob diese Isoformen mit den jeweiligen Kandidaten auf unterschiedliche Art und Weise interagieren (de Navas et al., 2011; Gebelein et al., 2002; Reed et al., 2010; Rogulja-Ortmann et al., 2014). Es zeigte sich, dass alle VC-Ubx Isoformen BiFC-Signale mit VN-Arm, VN-Dbr und VN-A2bp1 generieren und dass sich die Fluoreszenz in allen Fällen durch Mutation der UbdA-Domäne stark reduzierte (**Abbildung 7 A**). Eine Quantifizierung dieser Signale zeigte, dass die Interaktionshäufigkeit von UbxIa mit den Kandidaten jeweils geringer als die der UbxIVa Isoform war (**Abbildung 7 B**). Auch die Interaktion zwischen UbxIa und Exd (63,5 % BiFC positiver Zellen) war um circa 16 % geringer, als die UbxIVa-Exd-Interaktion (79,4 % BiFC-positiver Zellen). Mit diesen Daten konnte daher in lebenden Zellen gezeigt werden, was in früheren Studien bereits *in vitro* beschrieben wurde (Reed et al., 2010). Weiterhin zeigte die Quantifizierung, dass die BiFC-Signale zwischen allen Kandidaten und der Ubx^{UbdA}-Variante signifikant geringer ausfielen. Dies erlaubt den Schluss, dass es sich bei der UbdA-Domäne um eine zentrale Interaktionsdomäne von Ubx nicht nur für Exd sondern auch für weitere Interaktionspartner handelt.



B

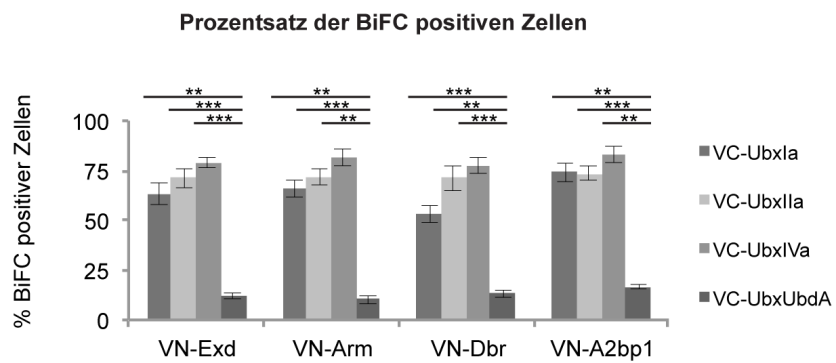


Abbildung 7: Analyse von Protein-Protein Interaktionen ausgewählter Kandidaten mit den verschiedenen Ubx-Isoformen.

(A) Gezeigt sind konfokale Aufnahmen von lebenden S2R+ Zellen, welche mit den angegebenen Konstrukten co-transfiziert wurden. Alle Proteine wurden entweder mit der N-terminalen Hälfte von Venus (VN) oder der C-terminalen Hälfte (VC) fusioniert. Eine Co-Transfektion der wildtypischen Ubx Isoformen (UbxIa, UbxIIa und UbxIVa) mit einem Kandidat (Exd, Arm, Dbr und A2bp1) führt bei einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen zu BiFC-Signalen. Die BiFC-Signale in der Ubx^{UbdA} Mutante sind hingegen bei allen Kandidaten stark reduziert. Die Interaktion zwischen den Ubx Isoformen mit Exd dient als Positivkontrolle, während die Interaktion mit der Ubx^{UbdA} Mutante als Negativkontrolle dient. (B) Relativer Prozentsatz BiFC positiver Zellen innerhalb aller transfizierten Zellen. Zu erkennen ist, dass UbxIa, UbxIIa und UbxIVa mit allen Kandidaten interagiert, wobei die Häufigkeit graduell von UbxIa zu UbxIVa ansteigt. Hingegen ist die Interaktion mit Ubx^{UbdA} und den jeweiligen Kandidaten in allen Fällen signifikant reduziert. Die gezeigten Daten stellen gemittelte Werte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten dar. n=3; ±SEM; Einweg-ANOVA: ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.005. Die in der Abbildung gezeigten Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Victoria Castro Illana erhoben

3.1.4 Zusammenfassung

Im ersten Schritt der Arbeit wurden Interaktionspartner von Ubx identifiziert. Mittels eines genetischen *Modifier*-Screens wurden 18 Kandidaten erhalten und diese durch eine Kombination aus Datenbank- und Literaturrecherche, sowie durch eine Expressionsanalyse auf drei Kandidaten eingegrenzt. Interaktionsstudien mit der BiFC bestätigten das Interaktionspotential der Ubx-Isoformen UbxIa, UbxIIa und UbxIVa mit Arm, Dbr und A2bp1 in einem für diese Zwecke entwickelten Zellkultursystem. Dabei konnte eine signifikant reduzierte Interaktion der Kandidaten mit der Ubx^{UbdA}-Mutante gezeigt werden, wodurch wahrscheinlich wird, dass es sich bei der UbdA-Domäne nicht nur um die Interaktionsdomäne für die Interaktion von Ubx und Exd handelt, sondern auch für andere Interaktionen verwendet wird.

3.2 Der Einfluss von Ubx auf die korrekte Innervation der ventro-lateralen Muskelgruppe

Nachdem Ubx-Interaktionspartner mittels BiFC in lebenden Zellen bestätigt werden konnten, stellte sich nun die Frage, ob und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt diese Interaktion während der Neurogenese von Relevanz sein könnte. In den letzten Jahren konnte vermehrt die Rolle von Wnt-Signalprozessen während der Entwicklung und Physiologie neuromuskulärer Kontakte in unterschiedlichen Spezies beschrieben werden (für Übersichtsartikel siehe (Koles and Budnik, 2012; Korkut and Budnik, 2009; Nose, 2012; Speese and Budnik, 2007)). Arm stellt einen integralen Faktor während des kanonischen Wnt-Signalweges dar (Valenta et al., 2012). Es konnten bereits grundlegende Rollen für Arm in Bezug auf die Neuroblastenspezifizierung und den strukturellen Aufbau des ZNS beschrieben werden (Loureiro and Peifer, 1998). In *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnte weiterhin eine Rolle von Bar-1/β-Catenin,

dem Homolog von Arm, auf die axonale Wegfindung entlang der A/P-Achse von Motoneuronen beschrieben werden (Maro et al., 2009). Da *Hox*-Gene an der Region-spezifischen Spezifizierung von Motoneuronen und der Ausbildung von neuromuskulären Kontakten beteiligt sind (Catela et al., 2016; Dixit et al., 2008; Friedrich et al., 2016; Jung and Dasen, 2015; Lacombe et al., 2013; Philippidou et al., 2012), wurde die Interaktion von Ubx und Arm in diesem Kontext untersucht. Um eine detaillierte Analyse der Interaktion durchführen zu können, bedurfte es zunächst einer detaillierten Beschreibung des thorakalen Neuromuskulären Systems auf morphologischer Ebene, welches im Gegensatz zu abdominalen Segmenten weniger ausführlich beschrieben wurde. Zwar konnten bereits einige teils detaillierte Charakterisierungen der thorakalen Muskeln aufgestellt werden (Bate, 1993; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997), teils auch mit Bezug auf einem Einfluss von *Hox*-Genen (Hooper, 1986; Michelson, 1994), dennoch wurden diese Analysen ohne den Aspekt neuronaler Innervation erstellt.

3.2.1 Morphologische Charakterisierung des neuromuskulären Systems in den Segmenten T1-A1

Das embryonale beziehungsweise larvale Neuromuskuläre-System ist Gegenstand zahlreicher Studien. Für das abdominale neuromuskuläre System (A2-A7) existiert eine sehr detaillierte Beschreibung aller 30 somatischen Muskeln und der 36 identifizierten Motoneurone, die sie innervieren (Landgraf et al., 1997; Nose, 2012). Dabei konnte sogar in vielen Fällen die Herkunft dieser Neurone aus der jeweiligen Stammzelle aufgeklärt werden (Landgraf et al., 1997). Eine Beschreibung des neuromuskulären Systems des Thorax und A1 war, soweit bekannt, nicht vorhanden, allerdings für die nachfolgende Analyse unverzichtbar. Zu Beginn der Interaktionsanalysen wurde daher zunächst eine detailliertere Karte des neuromuskulären Systems der Segmente T1-A1 generiert und dem bereits bekannten Muster von A2-A7 gegenüber gestellt. Hierfür wurden Muskeln mit anti-Myosin und Motoraxone mit dem Zelladhäsionsmolekül Fasciclin 2 (Fas2) (Harrelson and Goodman, 1988; Schuster et al., 1996) visualisiert. Bei der Bezeichnung der Muskeln wurde eine bereits publizierte Nomenklatur verwendet (Bate, 1993). Frühe Stadium 17 (Pereanu et al., 2007) WT und *w¹¹¹⁸* Embryonen wurden sowohl als Whole-Mount, als auch als Filetpräparationen analysiert. Zu diesem Zeitpunkt haben Motoneurone den Kontakt mit ihren Zielmuskeln aufgenommen und

beginnen funktionale Synapsen aufzubauen und zu differenzieren (**Abbildung 8 A**) (Broadie et al., 1993; Landgraf et al., 1997; Poreanu et al., 2007; Prokop, 1999). Um eine weitere Detailebene hinzuzufügen, wurden Embryonen analysiert, bei welchen zusätzlich die RP-Neurone RP1, RP3, RP4 und RP5 mit membranständigem *CD4::tdGFP* markiert wurden. Hierfür wurde der spezifische Treiber *dHb9-Gal4* (Broihier et al., 2002) verwendet, welcher in allen genannten RP-Neuronen, einigen weiter dorsal projizierenden Motoneuronen und einem begrenzten Set an Interneuronen aktiv ist (Broihier et al., 2002). Mit diesem Versuchsansatz konnten die Projektionen auf die ventralen Muskeln VL1, VL2, VL3 und VL4 detailliert untersucht werden (**Abbildung 8 B, C**). Die kombinierte Analyse lieferte eine detaillierte Karte der thorakalen Muskeln und der sie innervierenden Nerven mit besonderem Augenmerk auf die ventro-lateralen Muskeln (**Abbildung 8 B**). Im Folgenden sollen anhand der neuromuskulären Karte in **Abbildung 8 B** die RP-Neurone im Detail dargestellt und ein Fokus auf segmentspezifische Unterschiede gelegt werden.

Es konnte für die abdominalen Segmente A2-A7 gezeigt werden, dass RP5 sich mit VL1 in einen T-förmigen Kontakt verbindet (**Abbildung 8 B**) (Inaki et al., 2007; Landgraf et al., 1997). Weiterhin innerviert RP5 die Muskeln VO4, VO5, VL2, VL3 und VL4 (Mauss et al., 2009; Sink and Whittington, 1991). RP1 und RP4 nehmen Verbindung mit VL2 auf, während VL3 und VL4 durch RP3 mit einem feinen Kontakt zwischen den beiden Muskeln innerviert werden (**Abbildung 8 B**) (Kolodziej et al., 1996; Landgraf et al., 1997; Mauss et al., 2009).

Das abdominale Segment A1 entspricht in Großteilen den Segmenten A2-A7, weist jedoch einige Besonderheiten auf. So besitzt es keine Muskeln VT1 und VO6 (Bate, 1990). Weiterhin zeichnet es sich durch den ventralen internen Muskel VI1 aus, welcher in keinem anderen Segment zu finden ist (Bate, 1990; Bate, 1993; Hooper, 1986; Michelson, 1994). Er liegt intern auf den Muskeln VL3 und VL4 und nimmt nach posterior hin Kontakt mit den ventralen intersegmentalen Muskeln 1 bis 5 (VIS5) auf (Bate, 1993). Die ventralen intersegmentalen Muskeln waren in ihrer Morphologie schwer aufzulösen, weswegen sie mit einer unterbrochenen Linie umrandet sind (**Abbildung 8 B**). VI1 erhält eine Innervation aus dem Intersegmentalnerv b (ISNb), welche sich mit der GFP-Markierung verfolgen ließ und einen Unterschied zu den restlichen abdominalen Segmenten darstellt (**Abbildung 8 B und C**). Diese Innervation wurde dem sogenannten DC 1 Neuron zugeordnet (Matthes et al., 1995). A1 unterscheidet sich weiterhin von den restlichen abdominalen Segmenten durch eine

etwas kürzere Innervation von VL3/4 durch RP3, sowie eine weiter nach dorsal gezogene ISNb-Projektion, welche einen Kontakt mit dem Lateralen Bipolaren Dendritischen Zelle aufnimmt (LBD, **Abbildung 8**). In abdominalen Segmenten A2-A7 fusioniert das LBD mit dem Transversalnerv (TN), welcher in A1 und den thorakalen Segmenten fehlt (Gorczyca et al., 1994).

T3 unterscheidet sich von abdominalen Segmenten durch die Morphologie des Muskels VL1, welcher dorsal die gleichen Ansatzstellen mit dem Muskel LL1 aus A1 teilt. Diese Anordnung ist in keinem anderen Segment zu finden. Auch der LL1 in T3 besitzt eine andere Anordnung als in abdominalen Segmenten. Ähnlich wie in A1 besitzen die ISNb-Projektionen leichte Unterschiede. So findet sich auch hier eine weiter dorsal reichende Projektion des ISNb und Kontakt mit dem LBD. Weiterhin scheinen die RP1 und RP4 Innervationsstellen etwas größer und innervieren einen der Muskeln VIS1-5 mit einem dünnen Fortsatz. Dabei ist der genaue Ansatzpunkt dieser Muskeln in T3 nicht eindeutig feststellbar. Weiterhin ist die RP3 Projektion auf VL3/4 verkürzt (**Abbildung 8 B, C**).

Dem thorakalen Segment T2 fehlen im Vergleich zu T3 weitere Muskeln. Hooper beschreibt, dass diesem Segment die ventro-lateralen Muskeln fehlen (Hooper, 1986). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch mindestens drei Muskeln ausgemacht werden, die Ähnlichkeiten zu den ventro-lateralen Muskeln aufwiesen, was sich mit den von Bate publizierten Daten deckt (Bate, 1993). So erhielten diese Muskeln beispielsweise eine GFP-positive Innervation durch den ISNb, wobei die ventrale neuromuskuläre Verbindung starke Ähnlichkeit mit der von VL3/4 in den weiter posterior gelegenen Segmenten aufwies. Die Unterschiede zu den Ergebnissen von Hooper (Hooper, 1986) könnten durch den unterschiedlichen Analysezeitpunkt zustande kommen, könnten aber auch mit der generellen schweren Zugänglichkeit dieses Bereiches erklärt werden.

Dem thorakalen Segment T1 fehlen, verglichen mit den posterioren Segmenten, der Großteil der Muskeln. Zusätzlich weisen viele Muskeln eine stark abweichende beziehungsweise einzigartige Morphologie auf (**Abbildung 8**). Dennoch können dorsale, ventrale und laterale Gruppen von Muskeln voneinander unterschieden werden (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). In diesem Segment stellte sich die Analyse dorsaler Muskeln als besonders komplex dar. Für die ventralen Muskeln VIS 1-5 konnte zwar eine Innervation durch GFP-positive Neurone durch den ISNb beobachtet werden, allerdings dort wiederum nur im ventralen Bereich (vergleiche GFP-Muster mit Fas2 Muster in T1, **Abbildung 8 C**).

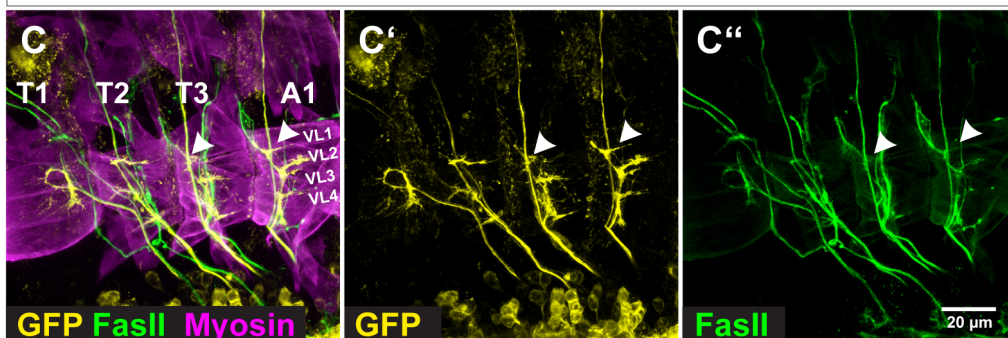
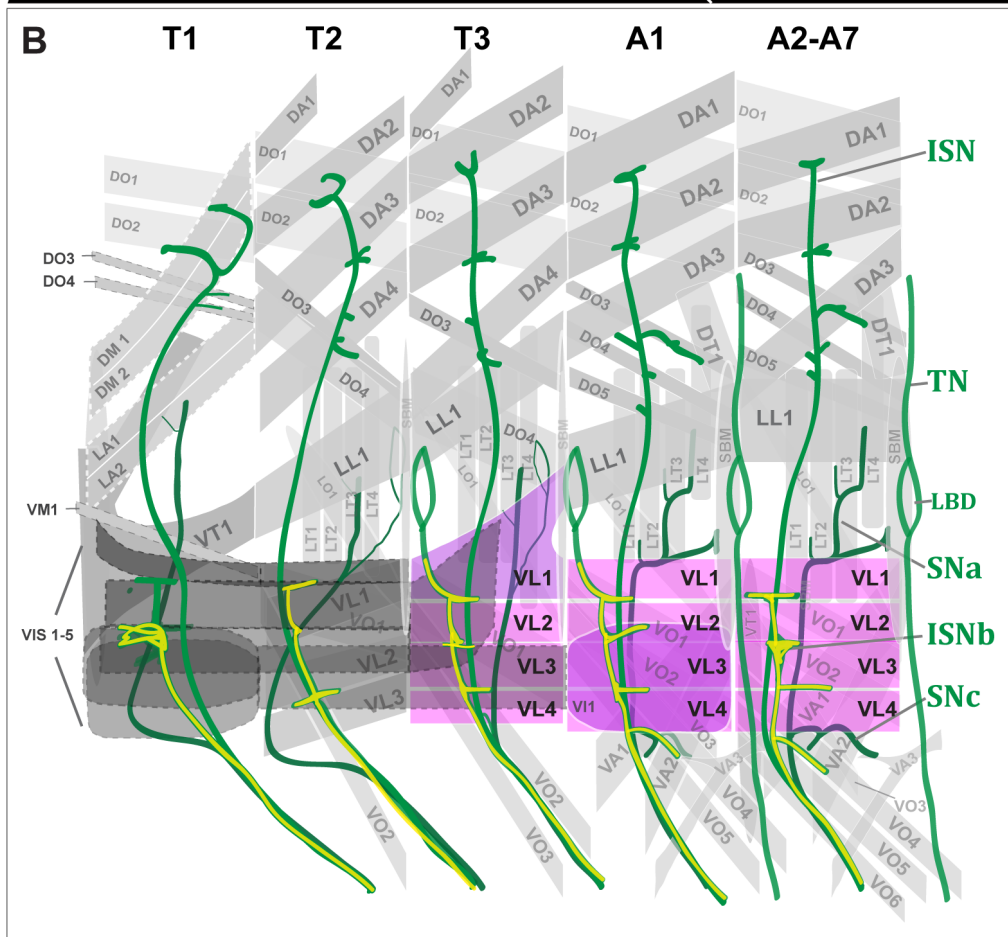
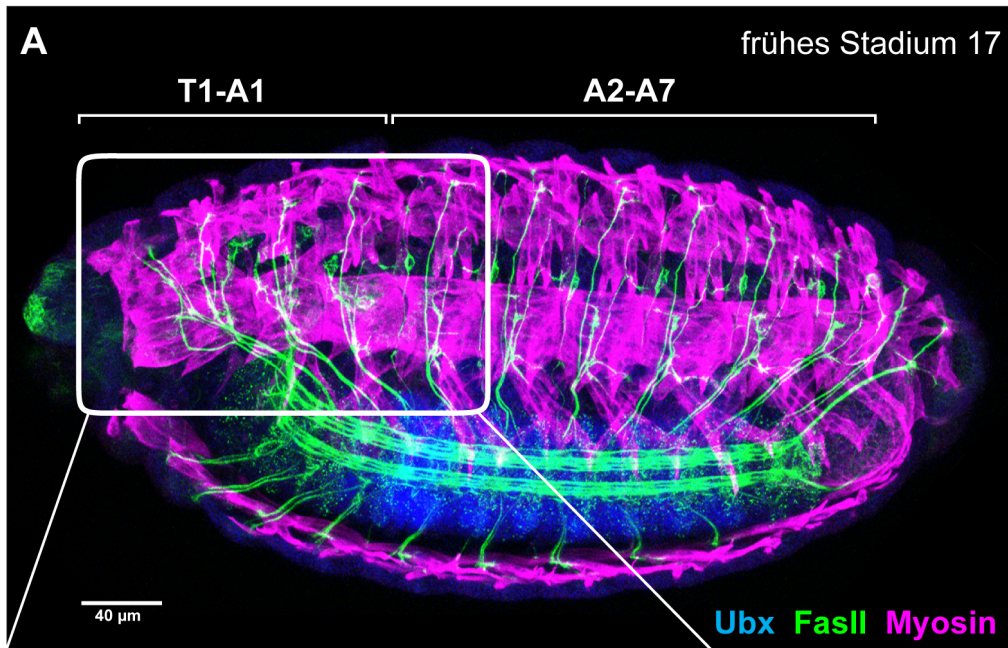


Abbildung 8: Morphologische Charakterisierung des Neuromuskulären Systems im späten Embryo.

Gezeigt sind thorakale (T1-T3) und abdominale (A1-A7) Segmente mit Fokus auf die Innervation der ventro-lateralen Muskeln. (A) Wildtypischer Whole-Mount Embryo (*w¹¹¹⁸*) in externer Ansicht. Die Motoneurone sind mit anti-Fas2 (grün) und Muskeln mit anti-Myosin (magenta) visualisiert. Im ZNS ist Ubx (blau) stark exprimiert. Das weiße Quadrat markiert den Bereich der schematisch in (B) dargestellt ist. (B) Interne Ansicht. Die für diese Arbeit relevanten Muskeln (VL1, VL2, VL3 und VL4) sind in Magenta gefärbt. Segmentspezifische Muskeln sind in einem dunkleren Ton dargestellt. Die Muskeln, bei denen die Morphologie und Identität nicht exakt bestimmt werden konnte, sind mit einer unterbrochenen Linie umzogen. Der Transversalnerv (TN) fehlt in thorakalen Segmenten und A1. (C-C'') Flach präparierter Embryo im frühen Stadium 17. Die Morphologie des Innervationsmusters der RP Neurone wurde mittels membranständigem UAS-*CD4::tdGFP* nach Aktivierung mit *dHb9-Gal4* verfolgt. Die Innervation von VL1 in T2, T3 und A1 ist mit den weißen Pfeilköpfen hervorgehoben. Zu beachten sind die segmentspezifischen Unterschiede im Hinblick des ISNb-Kontaktes mit dem LBD in T3 und A1. Abkürzungen: A anterior, P posterior, D dorsal, V ventral, TN Transversalnerv, ISN Intersegmentalnerv, SN Segmentalnerv, LBD Lateral Bipolar Dendritische Zelle.

3.2.2 Ubx ist nötig für die korrekte Innervation der ventro-lateralen Muskeln unabhängig von *abdA*

Nachdem ein detaillierter Überblick über das Neuromuskuläre System des späten Embryos erstellt wurde, wurde zunächst die Ubx Expression in Muskeln und RP-Neuronen analysiert. Es war bereits bekannt, dass Mutationen von *Ubx* zu einer Transformation der Muskeln von einem abdominalen Muster in ein T3 Muster führen (Hooper, 1986). Hooper analysierte auch die Expression von Ubx innerhalb der Muskeln der Larve und konnte zeigen, dass Ubx nicht in T3, schwach in A1, stark in A2 und A3 und muskelspezifisch in A4-A6 exprimiert wird (Hooper, 1986). Die Analyse der Ubx Expression innerhalb von Muskeln im späten embryonalen Stadium 14 zeigte hingegen eine Expression von A1-A7, wobei (**Abbildung 9 A' und B'**) die stärkste Expression in A2, A3 und A4 zu erkennen war, A1 und A5-A7 hingegen schwächere Expressionsspiegel zeigten. Der Bereich der ventro-lateralen Muskeln zeigte die stärkste Ubx-Expression (**Abbildung 9 B'**, VL Muskeln mit unterbrochener Linie umrandet).

Innerhalb des Nervensystems wird Ubx im Stadium 14 in Parasegmenten exprimiert (Maeda and Karch, 2006; Martinez-Arias and Lawrence, 1985; White and Wilcox, 1985). Die Expression ist vom posterioren T2 bis zum anterioren A7 erkennbar, wobei die Ubx-Spiegel im posterioren T3 und dem anterioren A1 am höchsten sind (**Abbildung 9 A und A'**).

Während dieser Entwicklungsphase erreichen die Wachstumskegel des ISN und des SN die Muskelfelder und beginnen mit der Erkundung der Zielmuskeln (Prokop, 1999; Sink and Whittington, 1991). Dies kann in dem Präparat durch die Visualisierung der Axone sowohl mit dem *dHb9-Gal4* getriebenem UAS-*CD4::tdGFP*-Signal (*dHb9 > CD4::tdGFP*, RP-Neurone und einige dorsal projizierenden Motoneurone), als auch mit dem Fas2-Signal (alle Motoneurone) untersucht werden (**Abbildung 9 A'', A''', B'' und B'''**). Im späten

Stadium 16 war von Interesse, wie sich die Ubx Expression in den RP-Neuronen darstellte. Hierfür wurde die *dHb9-Gal4* Linie verwendet, welche durch Kreuzung mit *UAS-CD4::tdGFP* (*dHb9 > CD4::tdGFP*) erlaubte, die Zellumrisse der RP-Neurone zu visualisieren und die Expression von Ubx innerhalb dieser Zellen zu analysieren (**Abbildung 9 C und C'**). Die stärkste Ubx Expression zeigte sich dabei in späten Stadien innerhalb von A1 und nahm nach anterior ab, wobei sich in T2 und T3 geringe und in T1 keine Ubx Expression detektieren ließ. RP-Neurone projizieren über den ISN in das als nächstes posterior folgende Segment, das heißt RP-Neurone des A1 innervieren die ventro-lateralen Muskeln in A2. Die Ubx-Expression in RP-Neuronen korreliert daher mit der Expression von Ubx innerhalb der Muskeln (**Abbildung 9 A und B**).

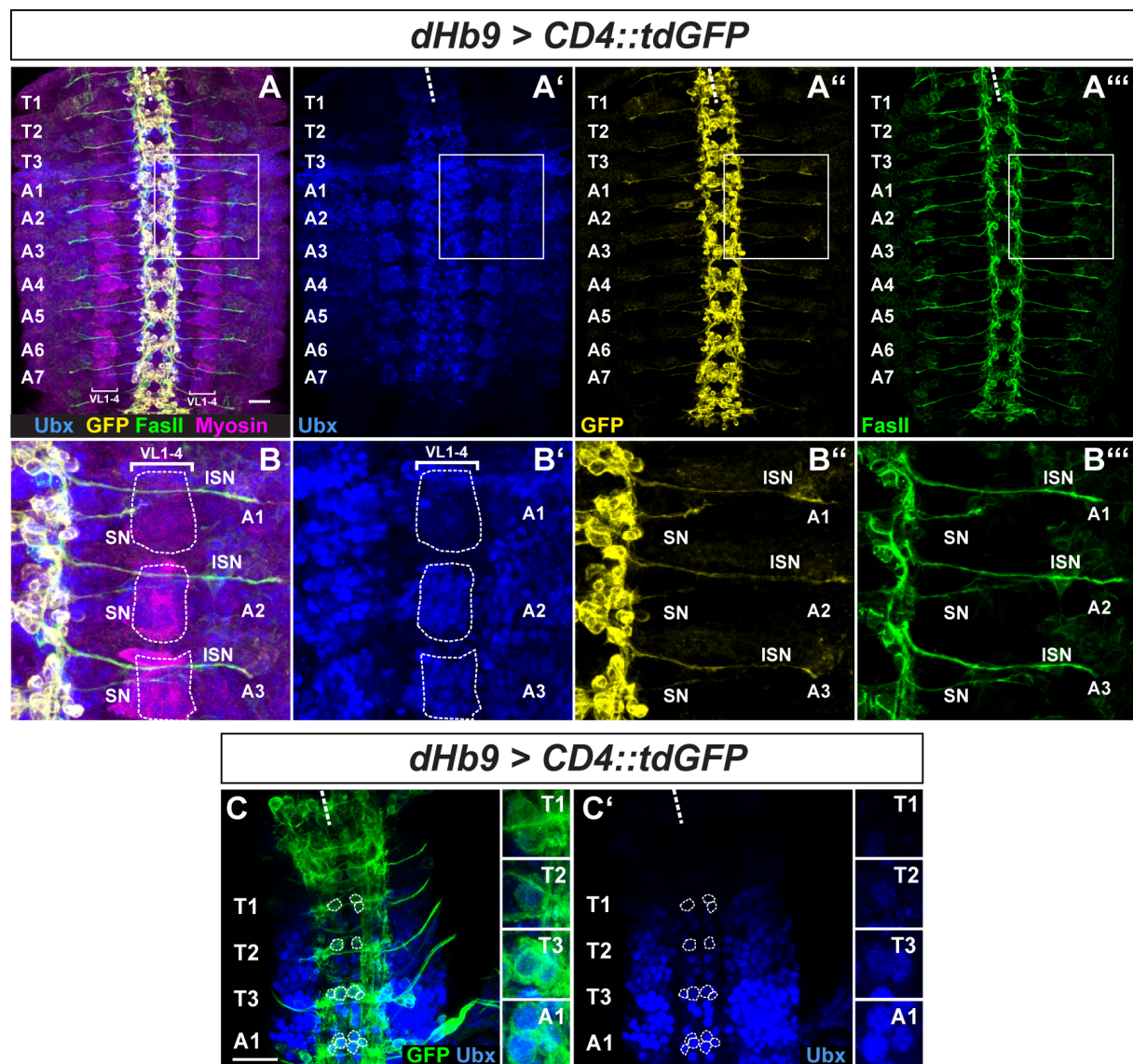


Abbildung 9: Ubx-Expressionsanalyse in ventro-lateralen Muskeln und RP Neuronen.

(A-B) Gezeigt ist ein flachpräparierter Embryo im späten Stadium 14 (A) und ein Embryo im frühen Stadium 17 (B) bei welchem die RP-Neuronen mit Hilfe von *dHb9-Gal4* getriebenem membranständigem GFP (*dHb9 > CD4::tdGFP*) visualisiert wurden. Weiterhin wurde mit anti-Ubx, anti-FasII und anti-Myosin gefärbt. Die unterbrochene Linie

deutet die Mittellinie an. Der Größenbalken repräsentiert 20µm. Anterior ist oben. (A) Ubx ist in ventro-lateralen Muskeln (unterbrochene Umrandung) in A1-A7 exprimiert. Die höchsten Expressionsspiegel finden sich in A2. In A1 hingegen ist nur eine sehr geringe Expression innerhalb der Muskeln zu erkennen (siehe auch Detailansichten). Während dieser Phase erreichen die Wachstumskegel die peripheren Muskeln (siehe auch Detailansichten) (B) Expressionsanalyse von Ubx in RP-Neuronen (mit unterbrochener Linie umrandet). Zu erkennen ist, dass insbesondere A1 hohe Expressionsspiegel von Ubx in den RP-Neuronen zeigt, während T2 und T3 geringere Expressionsspiegel aufweisen. In T1 ist Ubx in den RP-Neuronen nicht detektierbar (siehe auch Vergrößerungen).

Nach der Expressionsanalyse von Ubx innerhalb der Muskeln und RP-Neuronen wurde in *Ubx* Mutanten gezielt nach Veränderungen innerhalb des Neuromuskulären Systems gesucht. Hierfür wurden Antikörperfärbungen gegen Myosin und Fas2 benutzt, um in Filetpräparaten des frühen Stadiums 17 das neuromuskuläre System zu studieren. Da Ubx eine unterschiedliche Expression in Ektoderm Derivaten (inklusive des ZNS) (White and Wilcox, 1985) im Vergleich zu Mesoderm Derivaten (Muskeln) (Hooper, 1986) hat, stellte sich die Frage, wie sich das neuromuskuläre System nach Ausfall von *Ubx* verhält. In *Ubx¹* Mutanten im frühen Stadium 17 zeigte sich, dass die neuromuskulären Kontakte des ISNb mit den ventro-lateralen Muskeln in A2-A7 betroffen waren. Die neuronalen Projektionen blieben häufig im zentralen Bereich der Muskelgruppe abdominaler Segmente stehen und es schien keine terminale Differenzierung der neuromuskulären Kontakte zu erfolgen (**Abbildung 10, A-A'' und B-B''**).

Wie im vorherigen Kapitel erläutert lassen sich diese Kontakte recht exakt einzelnen Neuronen zuordnen und ihre Morphologie ist präzise beschrieben. So wird VL1 durch RP5 und das V-Neuron innerviert (Inaki et al., 2007; Landgraf et al., 1997). Zur Charakterisierung des Phänotyps wurden vier Kategorien eingeführt. In wildtypischen Embryonen verbindet sich im frühen Stadium 17 ein hoher Prozentsatz der ISNb Projektionen korrekt mit VL1 (88,8 %, n= 125) und bildet einen deutlichen T-förmigen Kontakt aus (Kategorie „korrekter Kontakt“). Ein schwacher Kontakt, bei welchem nur ein schmaler Neurit VL1 kontaktiert, zeigte sich in 8 % der analysierten Hemisegmente (Kategorie „schwacher Kontakt“). Lediglich 1,6 % der Hemisegmente zeigten keinen Kontakt mit VL1 (Kategorie „kein Kontakt“). Ebenso viele Hemisegmente zeigten eine Fehlleitung (Kategorie „Fehlleitung“). Mit dieser Kategorie wurden einige seltenere Ausprägungen zusammengefasst, welche beispielsweise einen Kontakt mit dem TN oder einer unregelmäßigen Verteilung im ventro-lateralen Muskelfeld umfassten. Im mutierten Hintergrund des amorphen *Ubx¹* Allels waren korrekte Kontakte in 10,3 % der Hemisegmente (n= 97) vorhanden und damit verglichen mit der Kontrolle signifikant reduziert (**Abbildung 10 B-B'', D**). Hingegen war die Kategorie „kein Kontakt

mit VL1“ mit 53,6 % verglichen mit der Kontrolle stark erhöht. Auch die reduzierten Kontakte (25,8 %) und die Fehlleitung (10,3 %) waren im Vergleich zur Kontrolle erhöht (**Abbildung 10 D**). Diese Verhältnisse waren ähnlich in der *Ubx¹/Ubx^{6.28}* transheterozygoten Kombination, was die *Ubx*-spezifische Rolle in diesem Prozess belegt (**Abbildung 10 D**).

Weiterhin wurde der Kontakt von RP3 auf VL3/4 in A2 bis A7 analysiert. Hierbei wurde ein analoges Kategorisierungssystem verwendet. Im WT wiesen 89,4 % (n=132) einen korrekten Kontakt auf, welcher sich in der Spalte zwischen VL3 und VL4 erstreckt. In 5,3 % kam es zu einem reduzierten, in 3 % zu keinem Kontakt und in 2,3 % zu einer Fehlleitung. In *Ubx¹*-Mutanten hingegen war der korrekte Kontakt mit 10,8 % (n=102) im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Die Kategorien „reduzierter Kontakt auf VL3/4“ (16,7 %), „kein Kontakt auf VL3/4“ (44,1 %) und „Fehlleitung“ (28,4 %) waren hingegen signifikant erhöht (**Abbildung 10 E**). Ähnliche Werte konnten auch für *Ubx*-Transheterozygote ermittelt werden.

Da die beobachteten Defekte auch im Expressionsbereich des nächst posterioren Hox Gens *abdA* lagen, stellte sich die Frage, welche möglichen Einflüsse *abdA* auf die Innervation der ventro-lateralen Muskeln haben könnte. Basierend auf der Morphologie wurde in *abdA^{MX1}* Mutanten häufig eine Transformation der Abdominalen Segmente nach T3/A1 beobachtet, bei welcher sich der ISNb-Kontakt weiter nach dorsal zog (gebogener Pfeil, **Abbildung 10 D**). Auch der VL1 erstreckte sich in *abdA^{MX1}* Mutanten leicht nach dorsal, wie es für T3/A1 beobachtet wurde. In *abdA^{MX1}* wurden vergleichsweise geringe Defekte der VL1 Innervation in A2-A7 beobachtet (korrekter Kontakt auf VL1: 83,5 %, n=130), wobei die Kategorie „Fehlleitung“ mit 13,4 % relativ hoch war. Der Kontakt auf VL3/4 war hingegen etwas stärker betroffen. Hier lag der Prozentsatz der korrekten Kontakte mit 56,9 % vergleichsweise niedrig und der Prozentsatz der reduzierten Kontakte auf VL3/4 war mit 26,9 % dementsprechend hoch. Dies könnte mit einer Transformation nach T3 oder A1 erklärt werden, da sich in diesen Segmenten auch im WT kürzere Kontakte auf diese beiden Muskeln finden (**Abbildung 10 B, C**).

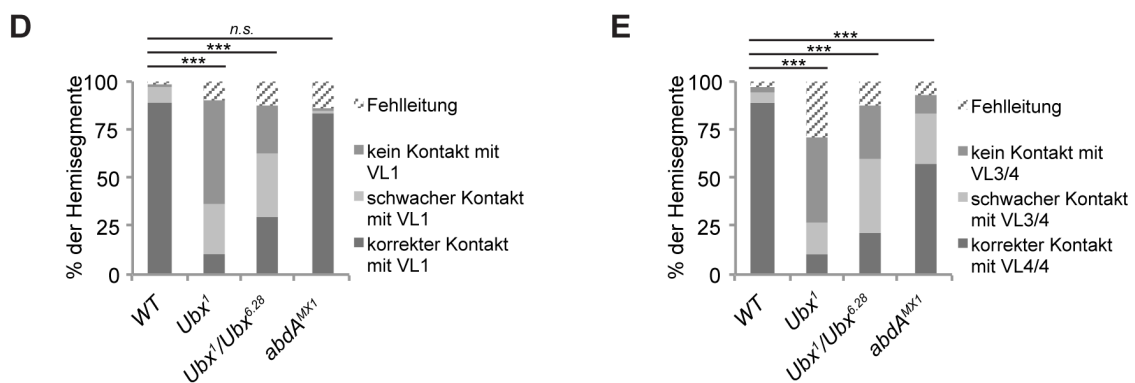
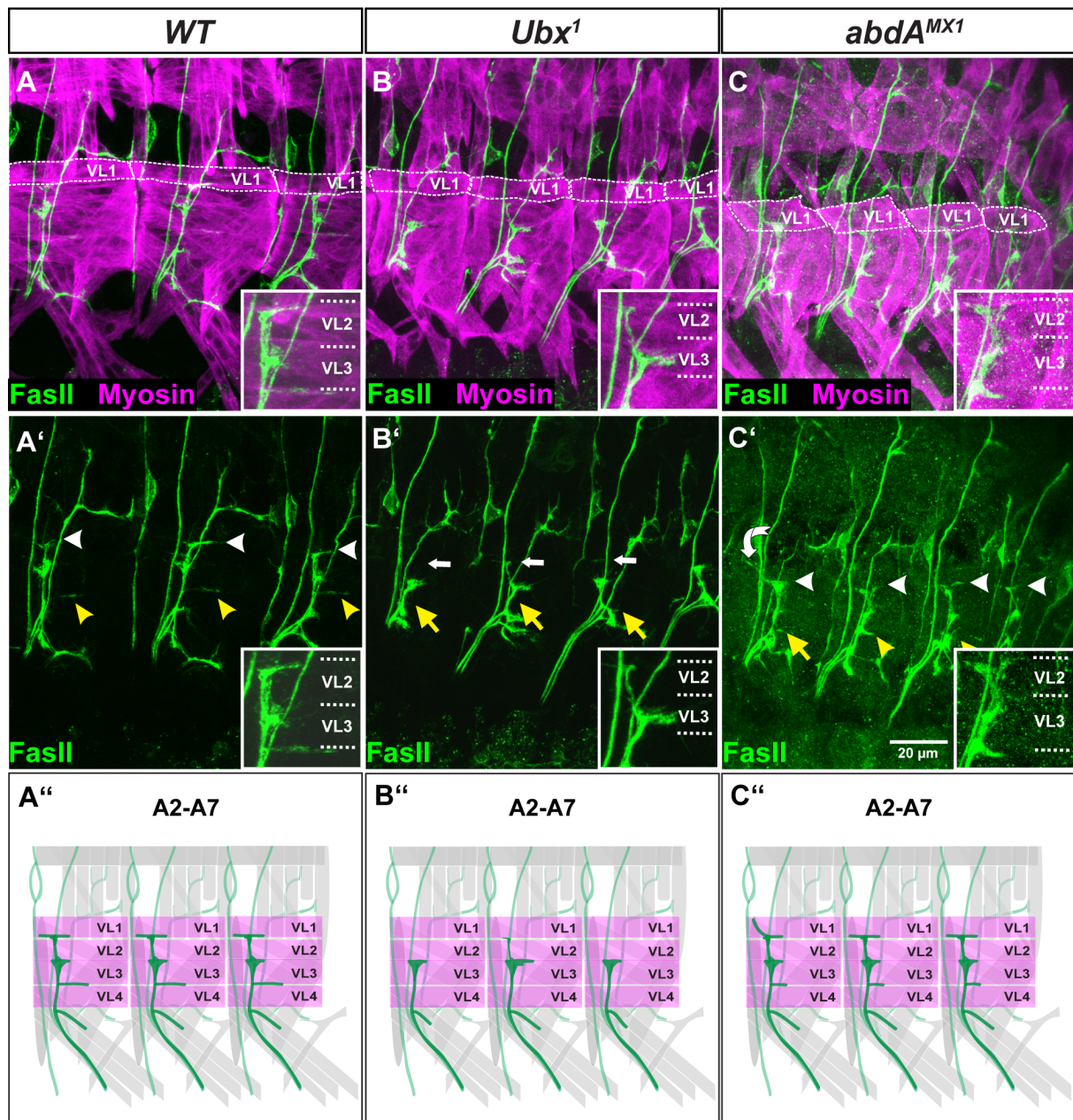


Abbildung 10: *Ubx* trägt zur Ausbildung des Innervationsmusters der ventro-lateralen Muskelgruppe in A2 bis A7 bei.

(A-C') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17 welche mit anti-Fas2 (Motoneurone, grün) und anti-Myosin (Muskeln, magenta) gefärbt wurden. Anterior liegt zur Linken und dorsal liegt nach oben. Die untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. A''-C'' zeigen Schemata der beobachteten Defekte. Der

ISNb ist in dunkelgrün dargestellt und die ventro-lateralen Muskeln sind in magenta eingefärbt. (A-A') In wildtypischen Embryonen wird VL1 in A2-A7 durch RP5 in einem T-förmigen Muster innerviert (weiße Pfeilköpfe). VL3/4 erhält eine Innervation durch RP3 welche sich in die Spalte der beiden Muskeln erstreckt (gelbe Pfeilköpfe, Vergrößerungen). Im Gegensatz dazu sind in homozygoten *Ubx¹* Mutanten die Innervationen von VL1 (weiße Pfeile) und die von VL3/4 (gelbe Pfeile) verkürzt (B und B'). In *abdA^{MX1}* Mutanten hingegen sind die VL1 Innervationen nicht betroffen, zeigen aber teils leichte Transformationen in Richtung T3/A1, welche sich weiter dorsal strecken (gebogener Pfeil, C-C'). Die Innervation von VL3/4 ist leicht verkürzt (weiße Pfeile, C-C'). (D, E) Quantifizierungen der ISNb Defekte in den untersuchten genetischen Hintergründen. *Ubx* Mutanten zeigen signifikante Defekte im Vergleich zur Kontrolle sowohl im Hinblick auf die Innervation von VL1 (D), als auch von VL3/4 (E). *abdA^{MX1}* hingegen zeigt keine signifikanten Unterschiede zu wildtypischen Kontrolle. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. Hierfür wurden die falschen Kontakte zusammengefasst (Fehlleitung, kein Kontakt, reduzierter Kontakt). *** $p \leq 0.005$, *n.s.* nicht signifikant. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: (E) WT: n=125, *Ubx¹/Ubx¹*: n=97, *Ubx¹/Ubx^{6.28}*: n= 95, *abdA^{MX1}*: n=127, (F) WT: n=132, *Ubx¹/Ubx¹*: n=102, *Ubx¹/Ubx^{6.28}*: n=89, *abdA^{MX1}*: n=130.

Im Anschluss an die Analyse in A2-A7 wurden die weiter anterior gelegenen Segmente T1-A1 in *Ubx¹* untersucht. Um die neuronalen Projektionen der RP-Neurone in diesem Kontext separiert darstellen zu können, wurde das *Ubx¹*-Allel mit *dHb9-Gal4* rekombiniert und mit einem Stamm, welcher *UAS-CD8::GFP* und das *Ubx¹*-Allel trug, gekreuzt (*dHb9 > CD8::GFP, Ubx1*). Hier zeigte T3 durch den Ausfall von *Ubx* keine Defekte der Muskeln. Auch die Projektionen des ISNb auf VL1 waren ähnlich wie im Wildtyp, was den Kontakt mit VL1 und mit dem LBD umfasste (Abbildung 11). Auch das A1 Segment schien nur wenig betroffen (Abbildung 11 A und B). Der Kontakt mit dem LBD und die Innervation durch den ISNb Zweig auf den VI1 waren vorhanden (Abbildung 11 A' und A'').

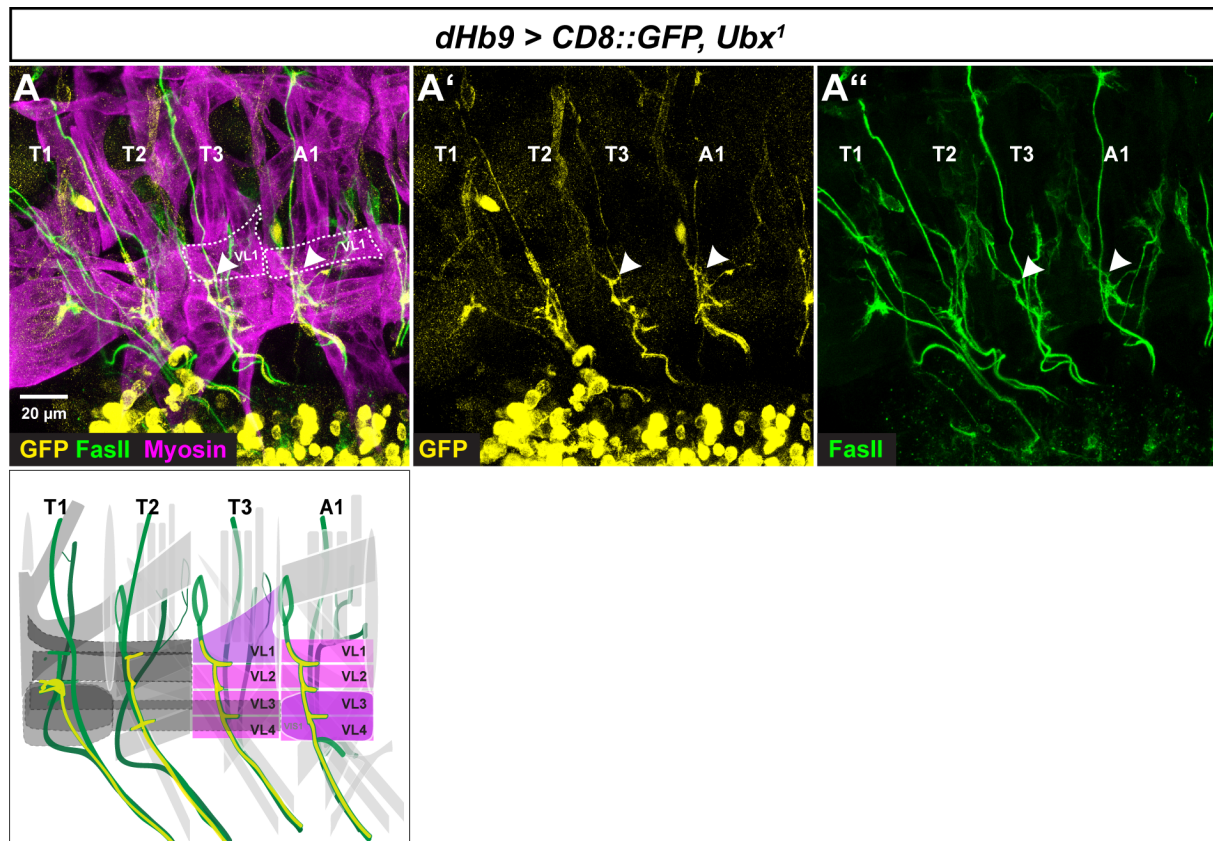


Abbildung 11: Der Verlust der *Ubx*-Funktion führt zu keinen morphologischen Unterschieden in T3 und A1.

(A-A'') Gezeigt ist ein flach präparierter Embryo im frühen Stadium 17, welcher mit anti-GFP (RP-Neurone, gelb), anti-Fas2 (Motoneurone, grün) und anti-Myosin (Muskeln, magenta) gefärbt wurde. Anterior liegt zur Linken und dorsal nach oben. Mit Hilfe von membranständigem GFP wurden die Projektionen der RP Neurone im *Ubx*-mutanten Hintergrund in den anterioren Segmenten analysiert. Es lassen sich keine deutlichen Unterschiede in T3 und A1 erkennen und der VL1 erhält eine Innervation durch den ISNb (Pfeilköpfe).

Um auszuschließen, dass die RP-Neurone in *Ubx*-Mutanten durch Apoptose degenerieren, wurden WT und *Ubx¹*-Mutanten mit Markern für die RP-Neurone gefärbt. Das Augenmerk lag hierbei insbesondere auf RP5, das aufgrund seiner ventralen Position innerhalb der RP-Gruppe am schwierigsten zu identifizieren ist. Als Marker wurden anti-dHb9 und anti-Cut verwendet (Tran and Doe, 2008). Es zeigte sich, dass alle RP-Neurone vorhanden waren. Insbesondere RP5 konnte durch anti-Hb9 und anti-Cut Doppelfärbung erkannt werden (**Abbildung 12**). Dies erlaubt den Schluss, dass die beobachteten neuromuskulären Defekte nicht aufgrund eines Fehlens von Neuronen zustande kommen.

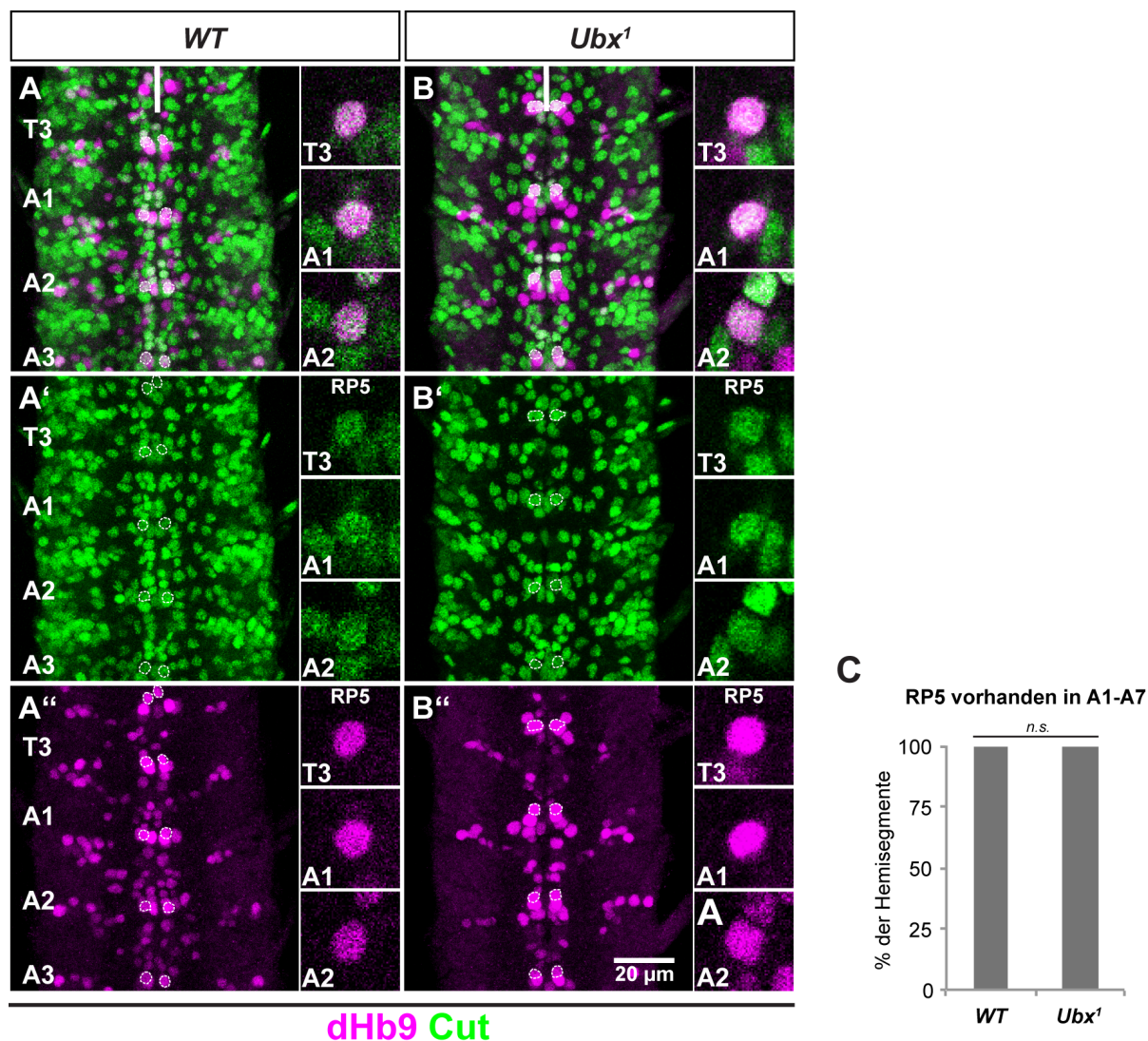


Abbildung 12: RP5 ist in *Ubx*-Mutanten vorhanden.

(A-B'') Gezeigt sind präparierte ZNS von Embryonen im frühen Stadium 17. Die Übersichten zeigen Maximalprojektionen der die RP Neurone umfassenden Bildstapel in thorakalen und abdominalen Segmenten. RP5 ist mit einer unterbrochenen Linie umrandet. Bei den Detailansichten handelt es sich um Einzelebenen. Alle RP Neurone wurden mittels anti-dHb9 (magenta) anhand ihrer stereotypen dorsalen Position identifiziert. RP5 wurde durch seine Co-Expression von anti-Cut (grün) erkannt. In beiden Genotypen ist RP5 eindeutig identifizierbar. Auch die temporale Identität anhand des Markers Cut ist nicht beeinflusst. Anterior ist oben. Die weißte Linie deutet die Mittellinie an. (C) Quantifizierung von RP5 in den Segmenten A1-A7 in WT und *Ubx*-Mutanten. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. n.s. nicht signifikant. Die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente beträgt in beiden Genotypen n=70.

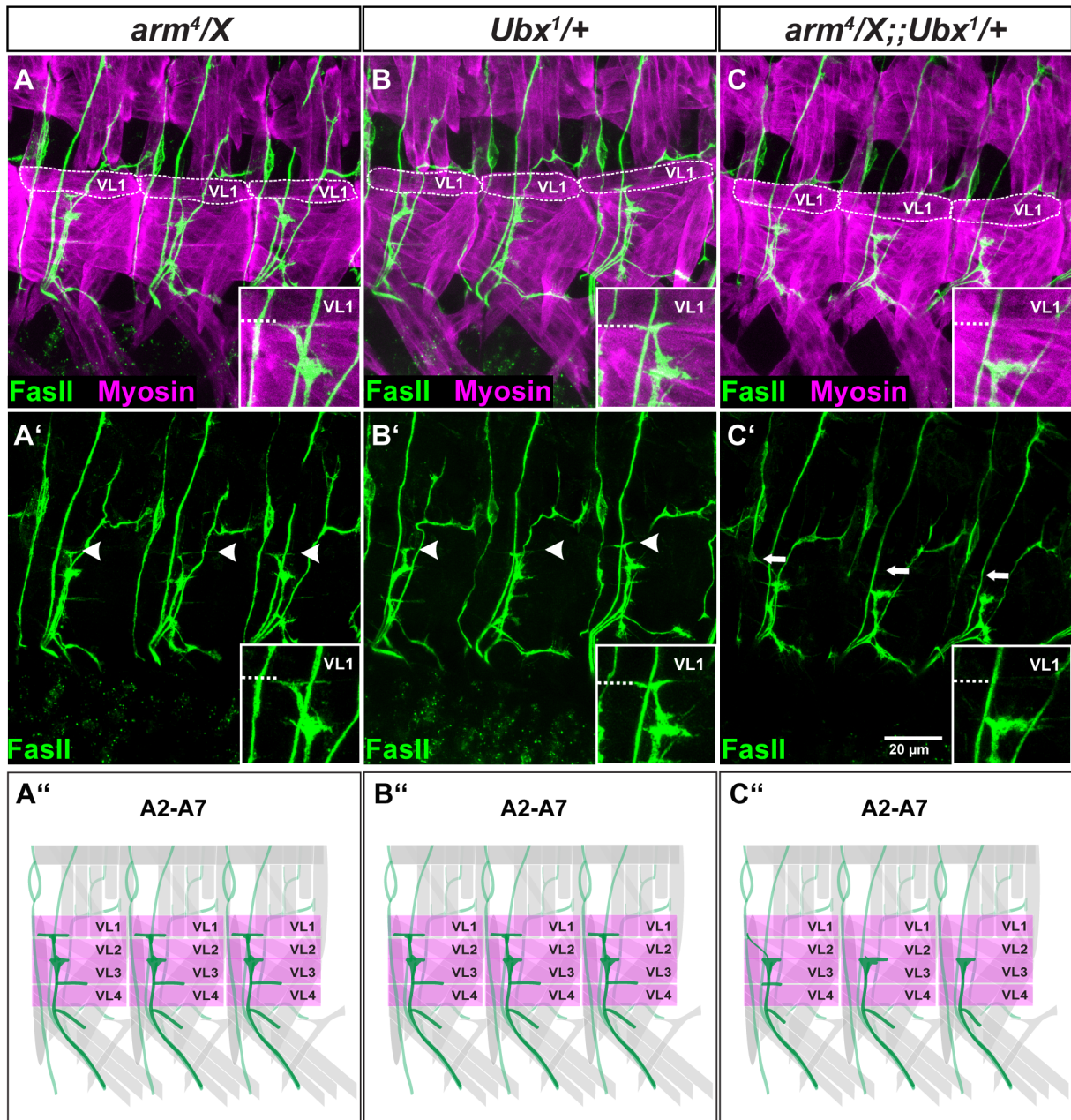
Ubx kontrolliert dementsprechend die Innervation der ventro-lateralen Muskeln von A2-A7, während der Einfluss auf A1 eher gering und bei T3 nicht vorhanden ist. *AbdA* scheint in diesem Prozess eine untergeordnete Rolle zu spielen, da der Ausfall von *abdA* nicht die gleichen Defekte wie der Ausfall von *Ubx* erzeugt. Da die ventro-lateralen Muskeln von den Transformationen auf morphologischer Ebene nicht betroffen waren, lagen wahrscheinlich molekulare Veränderungen in *Ubx* Mutanten vor. In den nächsten Schritten wurde daher untersucht, auf welchen Interaktionen der beobachtete Phänotyp beruht, welche Gene involviert sind und wie diese in den beteiligten Zelltypen wirken.

3.2.3 *Ubx* interagiert mit dem *Wnt4*- und dem *NetrinB*-Signalweg auf genetischer Ebene

Die molekularen Grundlagen der axonalen Wegfindung und Synapsenbildung des abdominalen neuromuskulären Systems von *D. melanogaster* wurden bereits detailliert beschrieben. Hierbei sind bereits zahlreiche muskelspezifische Faktoren bekannt, welche die neuromuskuläre Konnektivität steuern (Nose, 2012). So wird *Wnt4* von VL2 produziert und aktiviert den *Wnt4*-Signalweg in RP-Neuronen, was die Innervation des VL1 reguliert. In *Wnt4^{EMS23}*-Mutanten weisen die RP-Neurone verringerte Kontakte zu VL1 und vergrößerte Kontakte auf VL2 auf. Daher wurde auf eine Synapsen inhibierende Funktion von *Wnt4* geschlossen (Inaki et al., 2007; Inaki et al., 2010). Im Fall der Speicheldrüsenwanderung konnte eine Aktivierung des kanonischen Signalweges durch *Wnt4* gezeigt werden (Harris and Beckendorf, 2007). Ein entscheidendes Kennzeichen des kanonischen Signalweges ist die cytoplasmatische Stabilisierung von Arm und dessen Translokation in den Nukleus, was dort durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TCF zur Aktivierung von Ziel-Genen führt (Valenta et al., 2012). Da die *Ubx*-Mutanten einige Aspekte des *Wnt4*-Phänotyp aufwiesen (reduzierte Kontakte auf VL1, leicht verbreiterte Kontakte auf VL2) und Arm ein potentieller Interaktionskandidat aus dem Screen war, lag es nahe, genetische Interaktionen zwischen *Ubx* und der *Wnt4*-Signaltransduktion mit Arm als entscheidenden Mediator zu untersuchen.

Genetische Interaktionsstudien beruhen darauf, dass wenn zwei Gene in einem Prozess benötigt werden, die parallele Reduktion der Gendosis beider Kandidaten zu einem deutlichen Effekt führt, der bei der Reduktion eines der Kandidaten nicht oder nur in geringerem Ausmaß auftritt. Einfach heterozygote Kontrollen zeigten lediglich leicht verringerte Raten an korrekten Kontakten auf VL1 (*arm⁴/X* 74,5 %, n=94; *Ubx¹/+* n=69,9 %, n=123). Doppelheterozygote Embryonen der amorphen Allele *arm⁴* und *Ubx¹* zeigten hingegen eine gestörte Innervation des VL1 (38,3 %, n=107, **Abbildung 13**, vergleiche A-B'' mit C-C'', D). Dies spricht dafür, dass *arm⁴* und *Ubx¹* auf genetischer Ebene interagieren. Eine vergleichbare Interaktion zeigte sich auch für den Ligand *Wnt4* (**Abbildung 13, D**). Weiterhin wurde der *Wnt4*-vermittelte Einfluss auf die Innervation, wie sie von Inaki und Kollegen beschrieben wurde, mit dem hier verwendeten experimentellen Ansatz bestätigt (Inaki et al., 2007). *Wnt4^{EMS23}* homozygote Embryonen zeigten einen verringerten Prozentsatz an korrekten VL1 Kontakten (40,7 %, n=86)

(**Abbildung 13, D, Abbildung 14, A-A''**). Außerdem zeigten viele Hemisegmente einen reduzierten Kontakt mit VL1 (25,6 %) oder eine Fehlleitung (21 %) (**Abbildung 13, D**). Einige Kontakte auf VL2 waren, wie bei Inaki und Kollegen beschrieben, vergrößert (siehe **Abbildung 14, A-A''** (Inaki et al., 2007)).



D

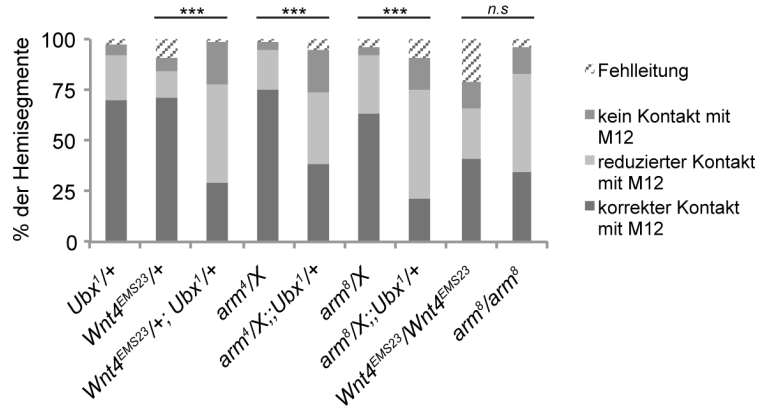


Abbildung 13: *Ubx* interagiert auf genetischer Ebene mit dem *Wnt4*-Signalweg während der Ausbildung des VL1 Kontakts in A2 bis A7.

(A-D') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-Fas2 (Motoneurone, grün) und anti-Myosin (Muskeln, magenta) gefärbt wurden. Anterior liegt zur Linken und dorsal liegt nach oben. Die untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. A''-C'' zeigen Schemata der beobachteten Defekte. Der ISNb ist in dunkelgrün dargestellt und die ventro-lateralen Muskeln sind in magenta eingefärbt. (A-B'') In heterozygoten Kontrollembryonen der Allele *arm⁴* beziehungsweise *Ubx¹* wird VL1 in A2-A7 durch RP5 in einem T-förmigen Muster innerviert, durch weiße Pfeilköpfe angezeigt. Im Gegensatz dazu sind in *arm⁴/X;;Ubx¹/+* Doppelheterozygoten Mutanten (C und C') die Innervationen von VL1 verkürzt (weiße Pfeile). (D) Quantifizierungen der ISNb Defekte in den untersuchten genetischen Hintergründen. Auf genetische Interaktionen mit *Ubx¹* wurden sowohl der *Wnt4*-Ligand, als auch *arm⁴* als eine Nullmutante, sowie *arm⁸* als eine spezifische Mutante des kanonischen Wg-Signalweges, getestet. Alle Doppelheterozygoten zeigen signifikante Defekte im Vergleich zur einfach heterozygoten Kontrolle im Hinblick auf die Innervation von VL1 (E). Auch homozygote *Wnt4^{EMS23}* und *arm⁸* Mutante zeigen deutliche prozentuale Reduktionen der korrekten Innervation von VL1. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. Hierfür wurden die falschen Kontakte zusammengefasst (Fehlleitung, kein Kontakt, reduzierter Kontakt). *** $p \leq 0.005$, n.s. nicht signifikant. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: *Ubx¹/+*: n=123, *Wnt4^{EMS23}/+*: n=130, *Wnt4^{EMS23}/+;Ubx¹/+*: n=103, *arm⁴/X*: n=94, *arm⁴/X;;Ubx¹/+*: n=107, *arm⁸/X*: n=60, *arm⁸/X;;Ubx¹/+*: n=70, *Wnt4^{EMS23}/Wnt4^{EMS23}*: n= 86, *arm⁸/arm⁸*: n=143.

Arm besitzt eine duale Funktion innerhalb der Zelle. Zum einen vermittelt es Zelladhäsionsprozesse durch die Verankerung des Zytoskeletts (Aktin) mit den Zonula Adherens. Zum anderen ist Arm der Mediator des kanonischen Wg/Wnt-Signalwegs, welcher nach Liganden-Aktivierung in den Nukleus wandert, um in Kombination mit TCF und weiteren Faktoren Zielgene zu steuern (Valenta et al., 2012). Um den direkten Einfluss von Arm in dem Prozess der VL1 Innervation zu untersuchen und zu analysieren, ob es sich um einen Adhäsionsdefekt oder einen Signaldefekt handelt, wurde das *arm⁸*-Allel verwendet. Dieses Allel stellt ein schwaches, temperatur-sensitives Allel dar, bei welchem ein P-Element in das sechste Exon inseriert wurde (Jones et al., 2010; Peifer and Wieschaus, 1990). Das exprimierte Arm Protein behält seine Funktion in den Zonula Adherens, verliert jedoch seine Fähigkeit Wnt-Signale weiter zu leiten (Loureiro and Peifer, 1998). Starke Allele wie *arm⁴* entwickeln sich nur bis zu dem Punkt, an dem die maternale Komponente aufgebraucht ist und können in späten Kontexten aufgrund einer Kombination aus Defekten der Zelladhäsion und der Signalweiterleitung homozygot nicht analysiert werden. Interessanterweise zeigten *arm⁸*-Mutanten bei 25 °C teils stark vergrößerte Projektionen auf VL2, während die Innervation des VL1 stark reduziert war (Abbildung 14, B-B''). Die Quantifizierung dieser Defekte ergab, dass lediglich 34,3 % der Hemisegmente (n=143) einen korrekten Kontakt mit VL1 aufnahmen, während 49 % einen reduzierten Kontakt mit VL1 besaßen. 13,3 % nahmen gar keinen Kontakt mit VL1 auf, was sehr stark den durch *Wnt4^{EMS23}* vermittelten Defekten ähnelte (Abbildung 13, D). Weiterhin konnten auch mit *arm⁸* genetische Interaktionen mit *Ubx¹* festgestellt werden (Abbildung 13, D).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *Ubx* mit dem Wnt4-Signalweg interagiert. Hierbei interagieren *arm* und *Ubx* auf genetischer Ebene und zeigen bei Mutation einen ähnlichen Phänotyp.

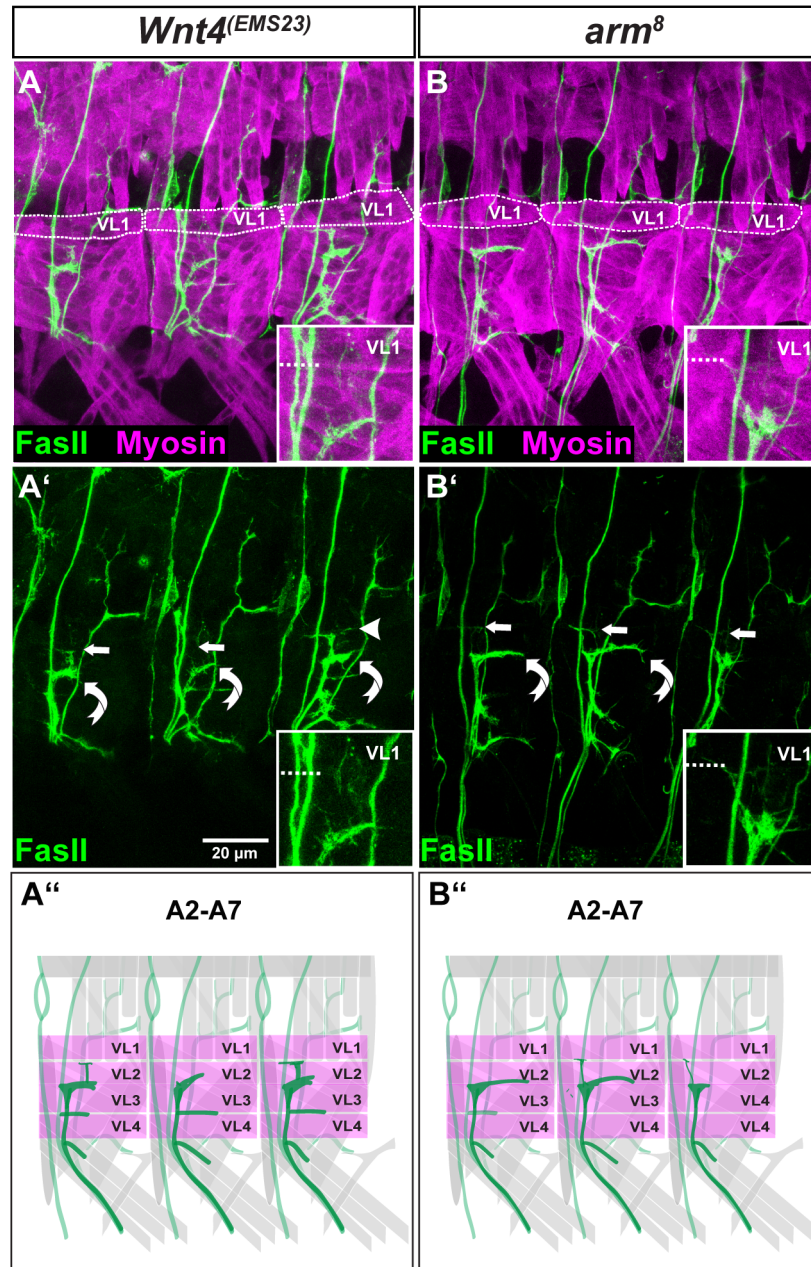


Abbildung 14: *Wnt4^{EMS23}* und *Arm⁸* zeigen vergleichbare Defekte während der VL1 Innervation.

(A-D') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-Fas2 (Motoneurone, grün) und anti-Myosin (Muskeln, magenta) gefärbt wurden. Anterior liegt zur Linken und dorsal liegt nach oben. Die untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. A'' und B'' zeigen Schemata der beobachteten Defekte. Der ISNb ist in dunkelgrün dargestellt und die ventro-lateralen Muskeln sind in magenta eingefärbt. (A-A') *Wnt4^{EMS23}* Mutanten zeigen reduzierte oder keine Kontakte auf VL1 (weiße Pfeilköpfe), während die Kontakte auf VL2 teilweise sehr stark vergrößert sind (gebogene Pfeile). (B-B') Noch stärker verhalten sich *arm⁸*-Mutanten, bei denen die Kontakte auf VL1 stark reduziert sind (weiße Pfeile), während jene auf VL2 vergrößert sind (gebogene Pfeile). Quantifizierungen finden sich in Abbildung 13.

Als nächstes wurden die Grundlagen der beobachteten VL3/VL4 Innervationsdefekte untersucht (**Abbildung 10**). Aufgrund der Innervationsfehler von VL3/4 in *Ubx¹*-Mutanten und einer demzufolge möglichen Fehlregulation in der neuronalen Wegfindung wurde der NetB-Signalweg analysiert (siehe **Abbildung 10**). *NetB* wird in VL3 und VL4 exprimiert und stellt ein attraktives Signal für RP3 dar. Dieses Signal wird durch den in diesem Neuron exprimierten Rezeptor *Fra* detektiert und bewirkt eine Attraktion des RP3-Wachstumskegels zu den Muskeln VL3/4 hin (Kolodziej et al., 1996; Labrador et al., 2005; Mitchell et al., 1996). Um diese Zusammenhänge zu untersuchen wurden genetische Interaktionsstudien mit dem Rezeptor *fra* und *Ubx* durchgeführt. Heterozygote Kontrollembryonen der Allele *Ubx¹* beziehungsweise *fra⁴* zeigten nur geringe Defekte in der RP3 Projektion auf VL3/4 (**Abbildung 15, A-B''**). 78,7 % (*Ubx¹/+*, n=127) beziehungsweise 87,5 % (*fra⁴/+*, n=144) der Hemisegmente wiesen eine korrekte Innervation der beiden Muskeln auf (**Abbildung 15, E**). Doppelheterozygote Embryonen der Null-Allele *fra⁴* und *Ubx¹* zeigten lediglich 56,9 % (n=167) korrekte Kontakte auf VL3/4. Ähnlich verhielten sich Doppelheterozygote aus dem amorphen *fra³*-Allel und *Ubx¹*. Hier wiesen lediglich 55,2 % der Hemisegmente (n=58) einen korrekten Kontakt auf VL3/4 auf. Beide Kombinationen zeigten damit ähnlich starke Defekte wie transheterozygote Embryonen der Allele *fra⁴* und *fra³* (**Abbildung 15, D-D'', E**, 41,7 % korrekter Kontakt auf VL3/4, n=139).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die gestörte Wegfindung des RP3 Neurons in *Ubx¹*-Mutanten durch den NetB-Signalweg reguliert wird. Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse ermöglichen jedoch noch keinen Rückschluss der spezifischen Funktion von *Ubx* innerhalb der beteiligten Zelltypen.

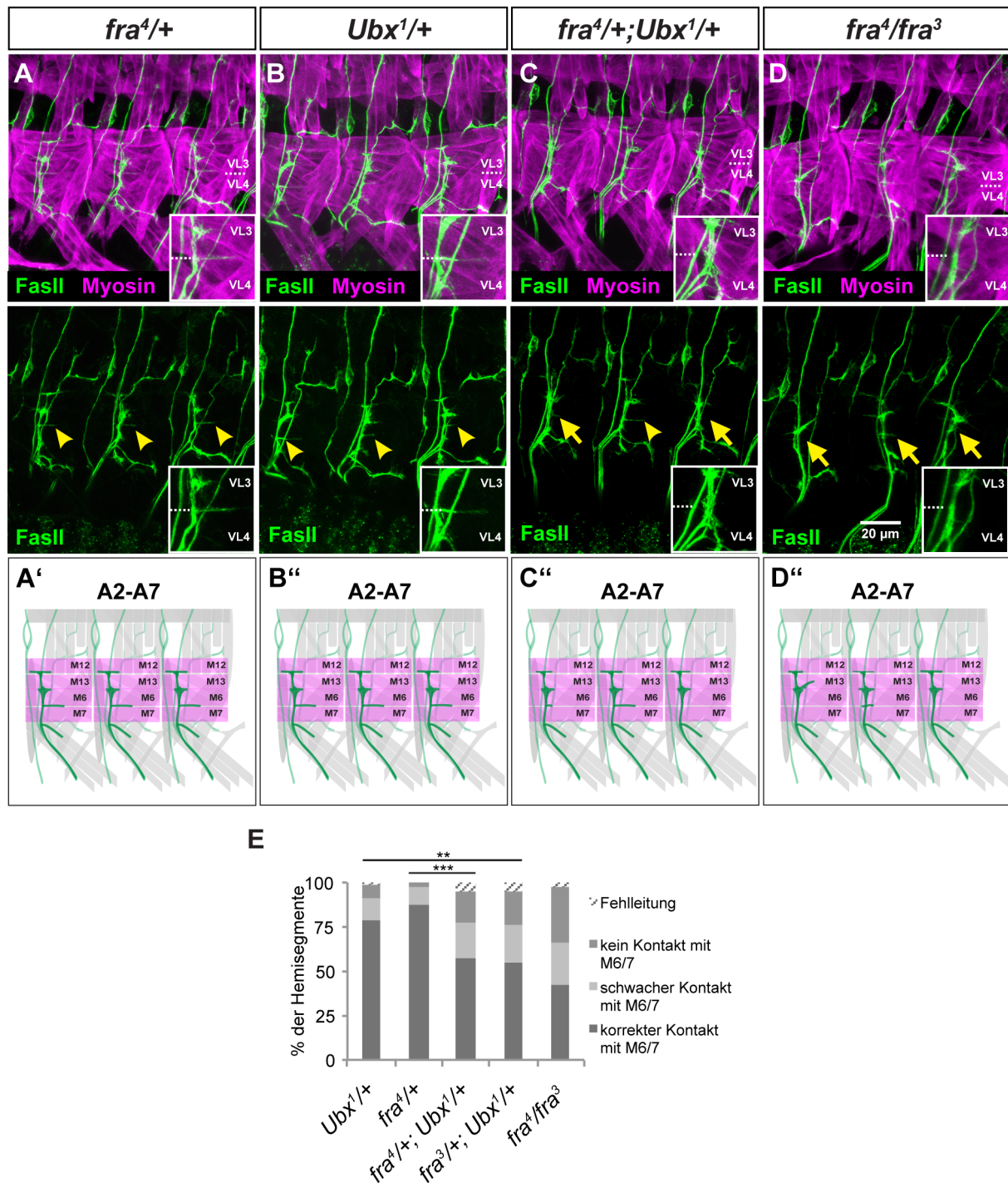


Abbildung 15: *Ubx* interagiert auf genetischer Ebene mit *fra* während der Ausbildung des VL3/4 Kontakts durch RP3 in A2 bis A7.

(A-D') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-Fas2 (Motoneurone, Grün) und anti-Myosin (Muskeln, Magenta) gefärbt wurden. Anterior liegt zur Linken und dorsal liegt nach oben. Die untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. A''-D'' zeigen Schemata der beobachteten Defekte. Der ISNb ist in dunkelgrün dargestellt und die ventro-lateralen Muskeln sind in Magenta eingefärbt. (A-B'') In heterozygoten Kontrollembryonen der Allele *fra*⁴ beziehungsweise *Ubx*¹ wird VL3/4 in A2-A7 durch RP3 innerviert (gelbe Pfeilköpfe). Im Gegensatz dazu sind in *fra*^{4/+}; *Ubx*^{1/+} Doppelheterozygoten Mutanten (C und C') die Innervationen von VL3/4 (gelbe Pfeile) verkürzt. (D-D') *fra*⁴/*fra*³ Transheterozygote Mutanten zeigen reduzierte oder keine Kontakte auf VL3/4 (weiße Pfeile). (E) Quantifizierungen der ISNb Defekte in den untersuchten genetischen Hintergründen. Sowohl *fra*^{4/+}; *Ubx*^{1/+} als auch *fra*^{3/+}; *Ubx*^{1/+} Doppelheterozygote zeigen signifikante Unterschiede verglichen mit der Einzelheterozygoten Kontrolle, welche fast so stark ausfallen wie in *fra*⁴/*fra*³ Transheterozygoten. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. Hierfür wurden die falschen Kontakte zusammengefasst (Fehlleitung, kein Kontakt, reduzierter Kontakt). **p

≤ 0.01 , *** $p \leq 0.005$. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: *Ubx*^{1/+}: n=127, *fra*^{4/+}: n=144, *fra*^{4/+;Ubx}^{1/+}: n= 167, *fra*^{3/+;Ubx}^{1/+}: n=58, *fra*^{4/fra}³: n=139.

3.2.4 Der kanonische Wnt4-Signalweg ist in RP-Neuronen aktiv

Im vorherigen Kapitel wurde eine genetische Interaktion zwischen *Ubx* und dem Wnt4-Signalweg im Hinblick auf die VL1 Innervation gezeigt. Weiterhin deuteten die Ergebnisse der *arm*⁸ Mutante auf eine Beteiligung von kanonischer Weiterleitung in diesem Prozess hin.

In früheren Studien wurde bereits der nachgeschaltete Prozess der Wnt4-Signaltransduktion diskutiert. So wurde gezeigt, dass Wnt4 den Wnt-Signalweg mit Frizzled-2 (Fz-2) und Derailed-2 (Drl-2) als Rezeptoren aktiviert, wodurch die Wegfindung und Synapsenbildung des RP5 reguliert wird (Inaki et al., 2007). Fz-Rezeptoren werden sowohl mit der kanonischen, als auch nicht kanonischen Signalweiterleitungen in Verbindung gebracht (Koles and Budnik, 2012). Außerdem wurde die Rolle von kanonischer Wnt4-Aktivierung (Fz und Fz-2 als Rezeptoren) während der Migration und Wegfindung der Speicheldrüse beschrieben (Harris and Beckendorf, 2007). Die Rolle von kanonischem Wnt-Signal innerhalb von Neuronen wurde bisher nur sehr begrenzt beschrieben, vor allem im Hinblick auf die Rolle von Arm in diesen Kontexten (Maro et al., 2009; Tan et al., 2013; Yu and Malenka, 2003).

Um die Rolle des Wnt4-Signalwegs in Neuronen zu überprüfen, wurden zum einen dGSK-3 (auch als *shaggy* (*sgg*) bezeichnet), zum anderen dTCF (auch als *pangolin* (*pan*) bezeichnet) als Komponenten des kanonischen Signalweges in RP-Neuronen analysiert (**Abbildung 16**). Die Kinase dGSK-3 phosphoryliert Arm unter nicht aktiven Wnt-Signalbedingungen, was eine Markierung für den Abbau durch das Proteasom darstellt und so zytoplasmatisches Arm eliminiert. Bindet Wnt an den Rezeptor Fz, so führt dies zu einer Reihe von nachgeschalteten Prozessen, die zur Hemmung von dGSK-3 führen, was wiederum die Stabilisierung von Arm zur Folge hat. Dieser Prozess führt zur Anreicherung von Arm im Cytoplasma und dem Nukleus (Valenta et al., 2012). Eine Erhöhung der dGSK-3 Spiegel innerhalb der Neurone mit *dHb9-Gal4* sollte daher zu einem verstärkten Abbau von Arm auch unter Signalbedingungen führen und, sofern der kanonische Signalweg innerhalb der RP-Neurone eine Rolle spielt, Defekte in der VL1 Innervation auslösen. Tatsächlich konnten bei Überexpression von dGSK-3 axonale Fehlleitungen beobachtet werden, wobei der Anteil an korrekten Kontakten mit VL1 auf

20,2 % sank (n=94). Der Anteil an reduzierten Kontakten auf VL1 stieg auf 55,3 % an (**Abbildung 16, B-B'**, E). Etwas schwächere, aber signifikante Effekte wurden durch die Expression von einem dominant negativen dTCF (UAS-*dTCF.DN*) Konstrukt erzielt (**Abbildung 16 D-D'**, E). Die korrekte Innervation von VL1 sank auf 59 % (n=105) und war signifikant niedriger als bei der Expression von UAS-*CD4::tdGFP* (81,5 %, n=81) und wildtypischem UAS-*dTCF* (84,7 %, n=137).

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass der kanonische Signalweg innerhalb der RP-Neurone einen entscheidenden Einfluss auf die korrekte Innervation des VL1 während der späten Embryogenese hat.

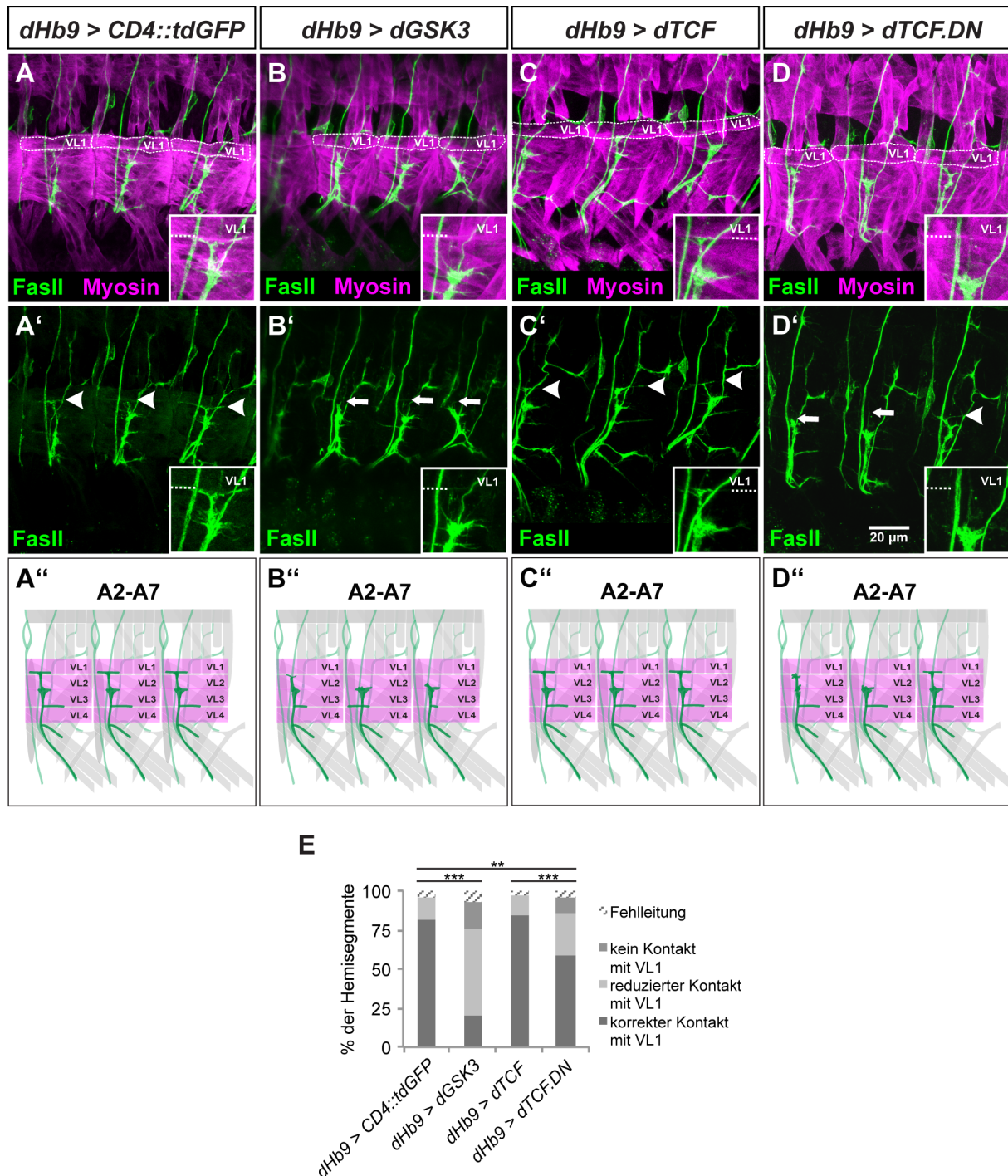


Abbildung 16: Der kanonische Wnt4-Signalweg ist in RP-Neuronen in A2 bis A7 aktiv.

(A-D') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-Fas2 (Motoneurone, grün) und anti-Myosin (Muskeln, magenta) gefärbt wurden. Anterior liegt zur Linken und dorsal liegt nach oben. Die untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. A''-D'' zeigen Schemata der beobachteten Defekte. Der ISNb ist in dunkelgrün dargestellt und die ventro-lateralen Muskeln sind in magenta eingefärbt. (A-A') In Kontrollembryonen wird VL1 in A2-A7 durch RP5 in einem T-förmigen Muster innerviert, durch weiße Pfeilköpfe angezeigt (siehe auch Detailansichten). (B und B') Die Überexpression von *dGSK3* führt zu deutlichen Defekten in der Innervation von VL1 (weiße Pfeile). (C und C') Die Überexpression von wildtypischen *dTCF* hat keinen Einfluss auf die Innervation von VL1. (D und D') Die Überexpression von einem dominant negativen *dTCF*-Konstrukt erzeugt Defekte in der VL1 Innervation. (E) Quantifizierungen der ISNb Defekte in den untersuchten genetischen Hintergründen. Die Überexpression von *dGSK3* und *dTCF.DN* zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle während die Überexpression von wildtypischem *dTCF* keinen signifikanten Unterschied generiert. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. Hierfür wurden die falschen Kontakte zusammengefasst (Fehlleitung, kein Kontakt, reduzierter Kontakt). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$. Mit n ist die

Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: *dHb9-Gal4 > UAS-CD4::tdGFP*: n=81, *dHb9-Gal4 > UAS-dGSK3*: n=94, *dHb9-Gal4 > UAS-dTCF*: n= 137, *dHb9-Gal4 > UAS-dTCF.DN*: n=105.

3.2.5 *Ubx*, *arm* und *fra* sind zellautonom in RP5 und RP3 für die korrekte Innervation von VL1 und VL3/4 nötig

Nachdem nun zum einen genetische Interaktionen zwischen *Ubx* und dem Wnt4-, sowie dem NetB-Signalweg belegt werden konnten, zum anderen gezeigt wurde, dass innerhalb der RP-Neurone der kanonische Wnt4-Signalweg aktiv ist, stellte sich nun die Frage, wann und wo der Einfluss von *Ubx* benötigt wird, um das abdominale Innervationsmuster der ventro-lateralen Muskelgruppe zu gewährleisten. Ein entscheidender Punkt hierbei war, ob *Ubx* in Muskeln oder innerhalb der RP-Neurone benötigt wird. Es wurde bereits gezeigt, dass *Hox*-Gene entscheidende Einflüsse auf die Identität (Dasen et al., 2003) und die Konnektivität (Baek et al., 2013; Catela et al., 2016; Dasen et al., 2005; Friedrich et al., 2016; Lacombe et al., 2013; Philippidou et al., 2012) von unterschiedlichen Motorneuronen haben. Daher wurde der Einfluss von *Ubx* innerhalb der RP-Neurone untersucht. Mittels RNAi wurde *Ubx* mit der *dHb9-Gal4* Linie spezifisch innerhalb der RP-Neurone inaktiviert und der Effekt auf die VL1 (**Abbildung 17 A**) und VL3/4 Innervation untersucht (**Abbildung 17 B**). Es zeigten sich signifikante Defekte in der VL1 (28 % der Hemisegmente mit korrektem Kontakt, n=107, **Abbildung 17 A**) und der VL3/4 Innervation (36,5 % der Hemisegmente mit korrektem Kontakt, n=96, **Abbildung 17 B**) verglichen mit der Kontrolle (VL1: 73,1 % korrekte Kontakte, n=78, **Abbildung 17 A**; VL3/4: 83,4 % korrekte Kontakte, n=78, **Abbildung 17 B**).

Der Effekt des *Ubx*-Knockdowns konnte nahezu vollständig gerettet werden, indem simultan zu dem UAS-*Ubx* RNAi Konstrukt ein UAS-*Ubx* Konstrukt exprimiert wurde (**Abbildung 17 A, B**). Dies legt nahe, dass der in der UAS-*Ubx* RNAi Linie beobachtete Defekt spezifisch ist und auf die Depletion von *Ubx* zurückzuführen ist.

Weiterhin wurde *arm* mittels RNAi depletiert, was zu vergleichbaren Defekten in der VL1 Innervation führte wie die Depletion von *Ubx* (29,6 % korrekte Kontakte auf VL1, n=142, **Abbildung 17 A**). Um simultane Knock-downs von *arm* und *Ubx* zu ermöglichen wurde das UAS-*Ubx* RNAi Konstrukt des *Transgenic RNAi Project* der Harvard Universität (TRiP) auf dem zweiten Chromosom inseriert. Nach Kreuzung mit *dHb9-Gal4* zeigten sich 27,7 % an korrekten Kontakten auf VL1, was den Zahlen der Insertion auf dem dritten Chromosom entspricht (n=83, **Abbildung 17 A**). Eine simultane Depletion von *Ubx* und *arm* führte zu einer niedrigeren Rate an korrekt innervierten VL1 (10,5 %, **Abbildung 17 A**).

n=95), welche vergleichbar mit der *Ubx*¹ Mutante war (**Abbildung 10 D**). Der verstärkte Effekt der parallelen Depletion von *Ubx* und *arm* deutete erneut auf eine genetische Interaktionen der beiden Komponenten hin, dieses mal allerdings spezifisch innerhalb der RP-Neurone und erhöht damit, in Kombination mit den Zellkulturdaten (Kapitel 3.1.3), die Wahrscheinlichkeit einer direkten Interaktion der beiden Faktoren innerhalb der RP-Neurone.

Um die Rolle von *fra* innerhalb des RP3 zu untersuchen (Kolodziej et al., 1996; Labrador et al., 2005) wurde dieses mittels RNAi in RP-Neuronen reduziert. Der beobachtete Defekt der VL3/4 Innervation (32,1 % korrekte Innervation, n=72, **Abbildung 17 B**) war mit dem von UAS-*Ubx* RNAi (36,5 % korrekte Innervation, n=96) vergleichbar.

Zusammenfassend konnte eine zellautonome Rolle von *Ubx* innerhalb postmitotischer RP-Neurone gezeigt werden. Die RNAi vermittelte Depletion von *Ubx* führt zu einer gestörten Innervation des VL1 und des VL3/4. Ähnliche Effekte zeigten sich bei RNAi vermittelter Depletion von *arm* für VL1, sowie *fra* im Hinblick auf VL3/4.

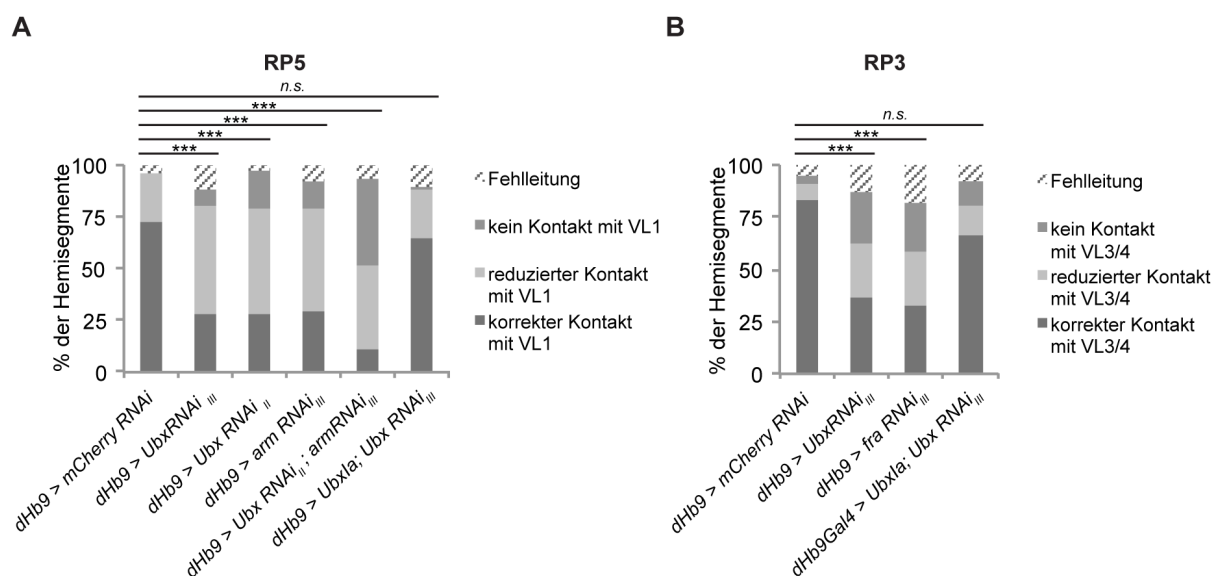


Abbildung 17: *arm*, *fra* und *Ubx* sind zellautonom in RP-Neuronen nötig, um eine korrekte Zielfindung zu gewährleisten.

(A) Quantifizierungen der korrekten VL1 Innervationsrate in frühen Stadium 17 Embryonen nach Depletion der angegebenen Faktoren in RP Neuronen. Die jeweiligen UAS Konstrukte wurden mit *dHb9-Gal4* getrieben. *Ubx* und *arm* haben ähnliche signifikante Effekte auf die Ausbildung korrekter neuromuskulärer Kontakte von VL1 im Vergleich zur UAS-*mCherry* RNAi Kontrolle. Die kombinierte Depletion verstärkt den Effekt. Die Expression eines UAS-*Ubxla* Konstrukts im UAS-*Ubx* RNAi Hintergrund kann den Depletionseffekt kompensieren. (B) Quantifizierungen der korrekten VL3/4 Innervationsrate in frühen Stadium 17 Embryonen nach Depletion der angegebenen Faktoren in RP Neuronen. Depletionen von *Ubx* und *fra* haben ähnliche Effekte auf die Ausbildung korrekter neuromuskulärer Kontakte auf VL3/4. Die Expression eines UAS-*Ubx* Konstrukts im UAS-*Ubx* RNAi Hintergrund kann den Depletionseffekt kompensieren. Römische Zahlen geben die Insertion auf dem jeweiligen Chromosom an. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. Hierfür wurden die falschen Kontakte zusammengefasst (Fehlleitung, kein Kontakt, reduzierter Kontakt). *** $p \leq 0.005$, n.s., nicht signifikant. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: (A) *dHb9-Gal4 > UAS-mCherry RNAi*: n=78, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx RNAi III*: n=107, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx RNAi II*: n= 83, *dHb9-Gal4 > UAS-arm RNAi*: n=142, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx RNAi*; UAS-*arm RNAi*: n=95, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx*; UAS-*Ubx RNAi*: n=120 (B) *dHb9-Gal4 > UAS-*

mCherry RNAi: n=78, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx RNAi III*: n=96, *dHb9-Gal4 > UAS-fra RNAi*: n= 72, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx; UAS-Ubx RNAi*: n=128.

3.2.6 *Ubx* ist nötig und ausreichend für die Expression von Wegfindungsfaktoren in ventro-lateralen Muskeln

Nachdem die Neuronen-spezifische Rolle von *Ubx* gezeigt wurde, wurde eine mögliche Rolle in den signalgebenden Muskeln untersucht. Das neuromuskuläre System des *D. melanogaster*-Embryos wurde in Bezug auf die Expression spezifischer Wegfindungsfaktoren detailliert studiert (Nose, 2012). Diese Faktoren stellten vielversprechende Zielgene von *Ubx* innerhalb spezifischer Muskeln dar. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde die Expression von *Wnt4* und *netB* in ventro-lateralen Muskeln näher untersucht. Außerdem wurde *Dsulf1* analysiert, welches laut der modENCODE Datenbank (www.modencode.org), ebenso wie *Wnt4* und *netB*, ein von *Ubx* reguliertes Zielgen darstellen könnte. Bei *Dsulf1* handelt es sich um eine extrazelluläre Sulfatase, welche bereits im Hinblick auf eine differentielle Muskelexpression und Effekten hinsichtlich neuronaler Wegfindung untersucht wurde (Inaki et al., 2007). Weiterhin wurde es als Modifikator in Zusammenhang mit verschiedenen Signalwegen gebracht, welche den Hedgehog-, TGF- β - und den Wnt-Signalweg umfassen (Bornemann et al., 2004; Dhoot et al., 2001; Wojcinski et al., 2011). Es wurden bereits spezifische Rollen von *Dsulf1* für die Stabilität und Ausbreitung von Wnt-Gradienten gezeigt (Dani et al., 2012; Dhoot et al., 2001; Fellgett et al., 2015; Kleinschmit et al., 2010; Tran et al., 2012).

Expressionsanalysen unter Nutzung von *in situ* Hybridisierung in Embryonen des späten Stadiums 14 zeigten für alle drei Kandidaten spezifische Expressionsmuster innerhalb der ventro-lateralen Muskeln (**Abbildung 18 A, A', C, C', E und E'**, Pfeilköpfe deuten auf die jeweilige Expression in ventro-lateralen Muskeln). In diesem Stadium suchen die in die Peripherie gewachsenen Wachstumskegel der Motoneurone nach ihren Zielmuskeln (siehe auch **Abbildung 9** (Broadie et al., 1993; Prokop, 1999)).

Für *Wnt4* konnte eine Expression innerhalb von VL2 und VA1 gezeigt werden (Inaki et al., 2007; Inaki et al., 2010; Nose, 2012), sowie eine graduelle Expression innerhalb des ZNS. Es konnte außerdem eine deutliche Expression innerhalb der Muskeln von A2 bis A7 festgestellt werden (**Abbildung 18 A, A'**). In A1 war die Expression entweder nur sehr schwach oder meist gar nicht detektierbar. *Ubx*¹-Mutanten hingegen fehlte die

Wnt4-Expression in Muskeln nahezu vollständig, während die Expression innerhalb des ZNS wenig bis gar nicht betroffen schien (**Abbildung 18 B, B'**).

Dsulf1 zeigte eine breitere Expression als *Wnt4*, welche die ventro-lateralen Muskeln von A1-A7 umfasste (**Abbildung 18 C, C'**). Hierbei waren die Expressionsspiegel in VL2 höher als die in VL1 (Inaki et al., 2007; Nose, 2012). In *Ubx¹*-Mutanten fehlte die *Dsulf1* Expression in A1 und A2 vollständig und die Expression in A3-A5 war deutlich geringer als im Wildtyp. In A6 und A7 war sie weitgehend normal (**Abbildung 18 D, D'**).

Die Expression von *netB* umfasste VL3 und VL4 (**Abbildung 18 E, E'**, Pfeilköpfe), sowie den dorsalen DA2 (**Abbildung 18 E, E'**) (Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Nose, 2012). Die Expression war von T2 bis A7 erkennbar (**Abbildung 18 E, E'**, Expression in T2 nicht gezeigt). Weiterhin konnte, wie es bereits beschrieben wurde, eine *netB* Expression in Neuronen des ZNS detektiert werden (Mitchell et al., 1996). In *Ubx¹*-Mutanten fehlte die *netB*-Expression von A1-A7 nahezu vollständig (**Abbildung 18 F, F'**). Die Expression im ZNS schien wenig bis gar nicht vom Ausfall von *Ubx* betroffen (**Abbildung 18 F, F'**).

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass *Ubx* nötig für die physiologische Expression von *Wnt4*, *Dsulf1* und *netB* innerhalb der ventro-lateralen Muskeln ist. Zusammengenommen deuten die erhaltenen Daten auf eine duale Rolle von *Ubx* in der axonalen Wegfindung hin, bei der zum einen die Expression von Liganden innerhalb der Zielmuskeln durch *Ubx* kontrolliert wird, zum anderen die Interpretation dieser Signale innerhalb der jeweiligen Motoneurone durch *Ubx* mitgesteuert wird.

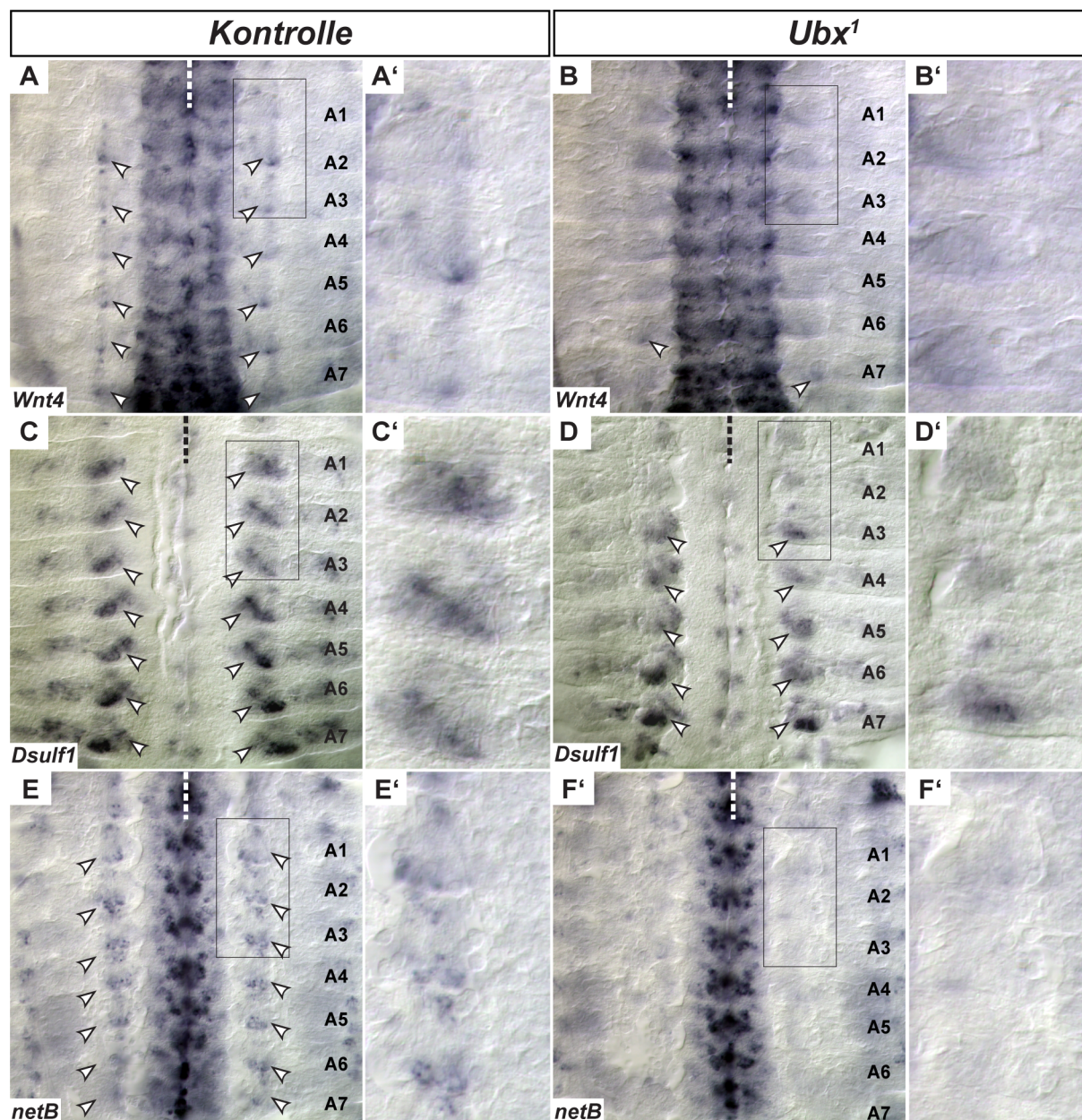


Abbildung 18: *Ubx* kontrolliert die Expression von *Wnt4*, *Dsulf1* und *netB*, Faktoren der axonalen Wegfindung, in ventro-lateralen Muskeln.

Gezeigt sind flach präparierte Embryonen des späten Stadium 14 nach *in situ* Hybridisierungen der angegebenen Faktoren im balancierten (Kontrolle) und homozygotem *Ubx¹* Hintergrund. Die Pfeilköpfe deuten auf eine vorhandene Expression des jeweiligen Faktors in der ventralen Muskelgruppe hin. Anterior ist oben, die unterbrochene Linie deutet die ventrale Mittellinie an. (A-B) Die Expression von *Wnt4* lässt sich als feiner Streifen in VL2 und VA1 in balancierten Kontrolltieren in den Segmenten A2-A7 erkennen. In A1 ist sie nur sehr schwach oder nicht detektierbar (A). In *Ubx¹*-Mutanten fehlt die *Wnt4* Expression in Muskeln nahezu vollständig, während die Expression im Nervensystem nicht nachweisbar beeinflusst ist (B). (C-D) Die Expression von *Dsulf1* lässt sich in Kontrolltieren in mehreren Muskeln nachweisen, welche den Ventro-lateralen Muskel VL2 umfasst (C). In *Ubx¹* Mutanten verringert sich diese Expression graduell nach posterior, wobei sich die normale Expression nur in A6 und A7 findet. In A1 und A2 fehlt sie vollständig, in A3-A5 ist sie deutlich reduziert (D). (E-F) Die Expression von *netB* lässt sich als punktiertes Signal in VL3/4 erkennen, wobei die Expression auch bis T2 detektierbar ist (nicht gezeigt). Weiterhin ist eine Expression weiter dorsal in DA2 zu erkennen (E). In *Ubx¹*-Mutanten fehlt diese *netB*-Expression nahezu vollständig, während die Expression im Nervensystem nicht merklich beeinflusst ist (F).

Als nächsten Schritt wurde überprüft, ob ektopisches *Ubx* im Hinblick auf frühe Genexpressionen ausreichend ist weiter anterior gelegene Segmente nach A2 zu transformieren und eine ektopische Expression von *Wnt4* und *Dsulf1* zu erzielen. Hierfür wurde *Ubx* mit *24B-Gal4* (Brand and Perrimon, 1993) in allen Muskeln ektopisch exprimiert. Aufgrund ihrer abdominal begrenzten Expressionsmuster wurden für diese Analyse *Wnt4* und *Dsulf1* verwendet (**Abbildung 19 A-D**). Im Wildtyp war die *Wnt4* Expression, wie zuvor gezeigt, in Muskeln im späten Stadium 14 in A2 bis A7 detektierbar, die von *Dsulf1* von A1 bis A7 (**Abbildung 19 A, C**). Nach Überexpression von *Ubx* in allen Muskeln ließ sich sowohl für *Wnt4* als auch für *Dsulf1* eine zusätzliche Expression in allen weiter anterior liegenden Segmenten beobachten (**Abbildung 19 B, D**).

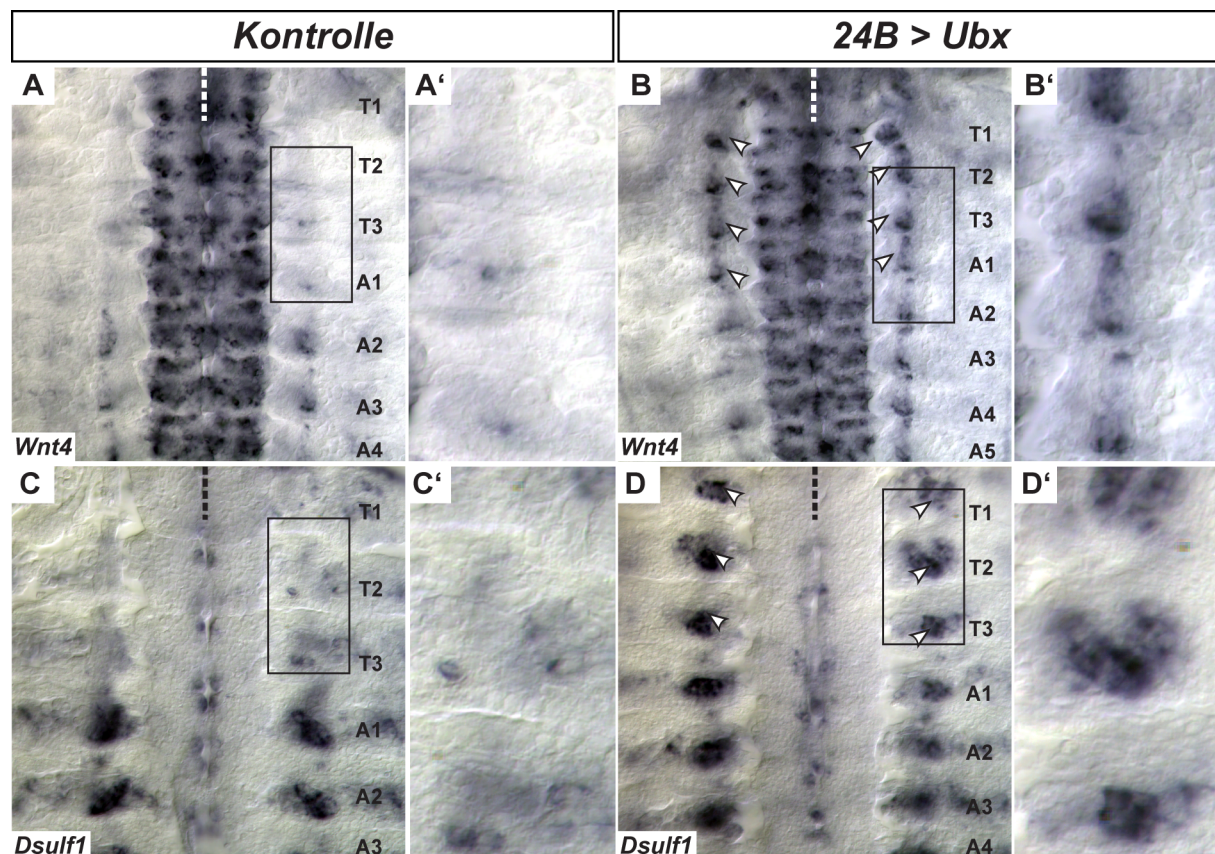


Abbildung 19: *Ubx* ist ausreichend für die Expression von *Wnt4* und *Dsulf1* in ventro-lateralen Muskeln.

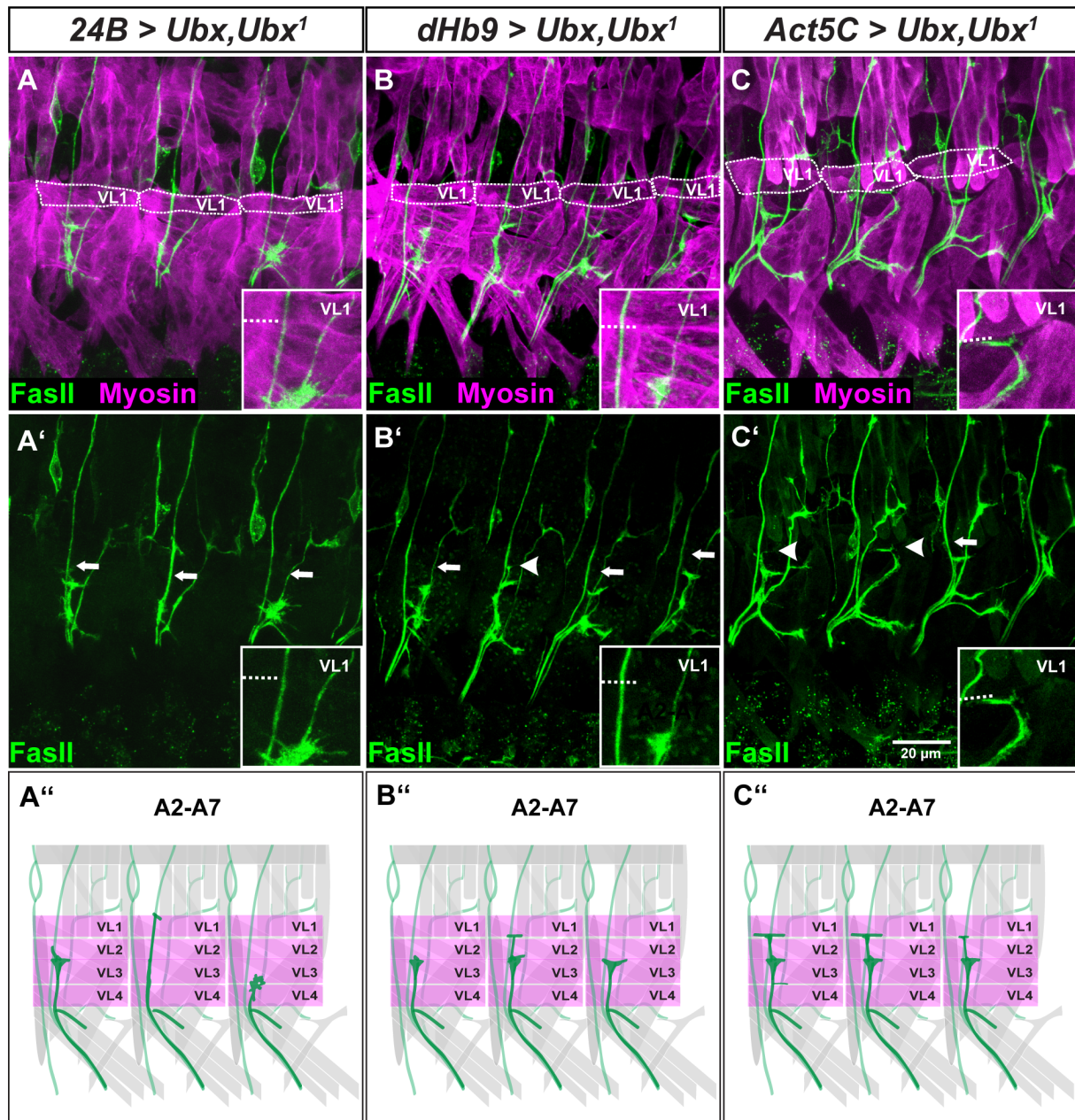
Gezeigt sind flach präparierte Embryonen des späten Stadium 14 nach *in situ* Hybridisierungen der angegebenen Faktoren im WT (Kontrolle) und nach Expression von *Ubx* in allen Muskeln (*24B > Ubx*). Die Pfeilköpfe deuten auf eine ektopische Expression des jeweiligen Faktors in der ventralen Muskelgruppe hin. Die Rechtecke geben die Bereiche des Vergrößerungsausschnitts auf der Rechten eines jeden Bildes an. Anterior ist oben, die unterbrochene Linie deutet die ventrale Mittellinie an. (A-B) In der Kontrolle wird *Wnt4* ab A2 in VL2 exprimiert, während keine Expression in den thorakalen Segmenten und A1 zu beobachten ist (A, A'). Nach Expression von *Ubx* in allen Muskeln mit *24B Gal4* ist eine ektopische Expression von *Wnt4* in allen thorakalen Segmenten und A1 erkennbar (B, B'). (C-D) In der Kontrolle wird *Dsulf1* ab A1 in ventro-lateralen Muskeln exprimiert, während keine Expression in den thorakalen Segmenten zu beobachten ist (C, C'). Nach Expression von *Ubx* in allen Muskeln mit *24B Gal4* ist eine ektopische Expression von *Dsulf1* in allen thorakalen Segmenten erkennbar (D, D')

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass *Ubx* nötig und ausreichend ist, um im Hinblick auf die Genexpression frühe Aspekte der A2 Muskelidentität zu vermitteln. In diesem Zusammenhang ist anzunehmen, dass ein komplexes Regulationsnetzwerk zwischen den Motoneuronen und den Muskeln vorhanden ist, welches von *Ubx* dirigiert wird und auf einer genau abgestimmten Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen beruht.

3.2.7 Gewebsspezifische Rettungsversuche in der *Ubx¹*-Mutante bestätigen eine duale Rolle von *Ubx* während der Etablierung neuro-motorischer Netzwerke

Zur Klärung der Funktionen von *Ubx* innerhalb von Neuronen und Muskeln wurden zellspezifische Rettungsexperimente der *Ubx¹*-Mutante durchgeführt. Im *Ubx¹* mutanten Hintergrund wurde *Ubx* in unterschiedlichen Geweben zur Expression gebracht und der Effekt auf die VL1 Innervation analysiert. Für die muskelspezifische Expression von *Ubx* wurde *24B-Gal4* und *Mef2-Gal4* verwendet. Hierbei konnte keine Rettung der Innervation von VL1 erzielt werden (**Abbildung 20 A-A''**). Die meisten Axone endeten unterhalb von VL1 oder nahmen untypische Wege, zum Beispiel über den ISN (**Abbildung 20 A-A''**). Der Anteil an korrekten Kontakten auf den VL1 war mit 12 % (n=75; *24B-Gal4*) beziehungsweise 2 % (n=53; *Mef2-Gal4*) deutlich niedriger als im Wildtyp (88,8 %; n=125) und nicht signifikant unterschiedlich zur *Ubx¹*-Mutante (**Abbildung 20 D**). Auch die Expression innerhalb postmitotischer RP-Neurone mit *dHb9-Gal4* (6,95 %, n=72), sowie im Neuroektoderm mit *sca-Gal4* (8,5 %, n=117) führte zu keiner Rettung. Die Expression mit *dHb9-Gal4* beziehungsweise *sca-Gal4* zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu *Ubx¹* (**Abbildung 20 B-B''** und **D**).

Die ubiquitäre Expression von UAS-*Ubx* mit *Actin5C-Gal4* (*Act5C-Gal4*) im *Ubx¹* mutanten Hintergrund führte zu einer korrekten Innervationsrate von VL1 in 38,7 % der Hemisegmente (n=168) (**Abbildung 20 D**) und damit deutlich vermehrten wildtypischen Kontakten auf VL1 (**Abbildung 20 C-C''**). Dies war die höchste erreichte Rate an korrekten Kontakten auf VL1 und kann als partielle Rettung der VL1 Innervation gewertet werden.



D

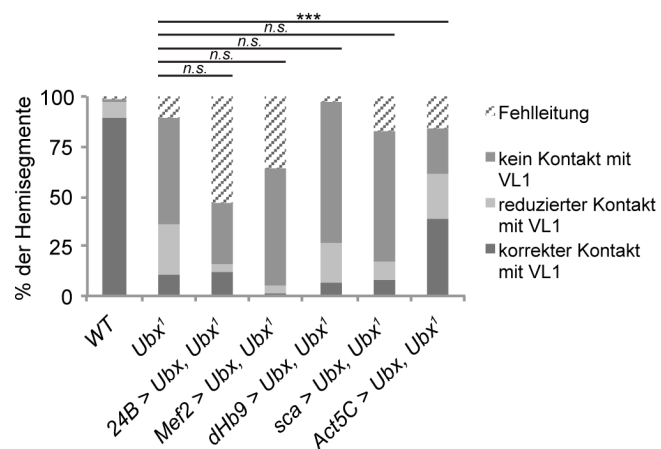


Abbildung 20: *Ubx* ist von A2 bis A7 sowohl in VL1 als auch in RP5 nötig, um eine korrekte Innervation zu gewährleisten.

(A-C') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-Fas2 (Motoneurone, grün) und anti-Myosin (Muskeln, magenta) gefärbt wurden. Anterior liegt zur Linken und dorsal liegt nach oben. Die

untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. **A**–**C** zeigen Schemata der beobachteten Defekte. Der ISNb ist in dunkelgrün dargestellt und die ventro-lateralen Muskeln sind in magenta eingefärbt. (**A** und **A'**) Die Expression von *UAS-Ubx* in allen Muskeln mit *24B-Gal4* in einem *Ubx¹*-mutanten Hintergrund führt zu keiner Rettung der Innervation von VL1 (weiße Pfeile). (**B** und **B'**) Die Expression von *UAS-Ubx* in allen RP-Neuronen mit *dHb9-Gal4* in einem *Ubx¹*-mutanten Hintergrund führt zu keiner Rettung der Innervation von VL1 (weiße Pfeile). (**C** und **C'**) Die ubiquitäre Expression von *UAS-Ubx* Muskeln und Neuronen mit *Act5C-Gal4* in einem *Ubx¹*-mutanten Hintergrund führt zu einer partialen Rettung der Innervation von VL1 (schwarze Pfeilköpfe). (**D**) Quantifizierungen der VL1 Innervation in den verschiedenen genetischen Rettungsversuchen. Die Unterschiede zwischen den der muskulären beziehungsweise neuronalen Rettungsversuchen und der *Ubx¹* Mutante sind nicht signifikant. Nur in der ubiquitären Rettung (*Act5C-Gal4*) wird eine deutliche Steigerung der Kategorie „korrekter Kontakt mit VL1“ auf nahezu 40 % erzielt. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. Hierfür wurden die falschen Kontakte zusammengefasst (Fehlleitung, kein Kontakt, reduzierter Kontakt). *** $p \leq 0.005$, n.s., nicht signifikant. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: *WT*: n=125, *Ubx¹/Ubx¹*: n=107, *24B-Gal4 > UAS-Ubx, Ubx¹/Ubx¹*: n= 75, *Mef2-Gal4 > UAS-Ubx, Ubx¹/Ubx¹*: n= 53, *dHb9-Gal4 > UAS-Ubx, Ubx¹/Ubx¹*: n= 72, *sca-Gal4 > UAS-Ubx, Ubx¹/Ubx¹*: n= 117, *Act5C-Gal4 > UAS-Ubx, Ubx¹/Ubx¹*: n= 168.

Um zu überprüfen, ob *Wnt4* im Muskel-spezifischen Rettungsansatz wiederhergestellt wird, wurde die *Wnt4* Expression im *Ubx¹* mutierten Hintergrund nach ektopischer Expression von *Ubx* untersucht (**Abbildung 21**). Es zeigte sich, dass die *Wnt4*-Expression gerettet werden konnte.

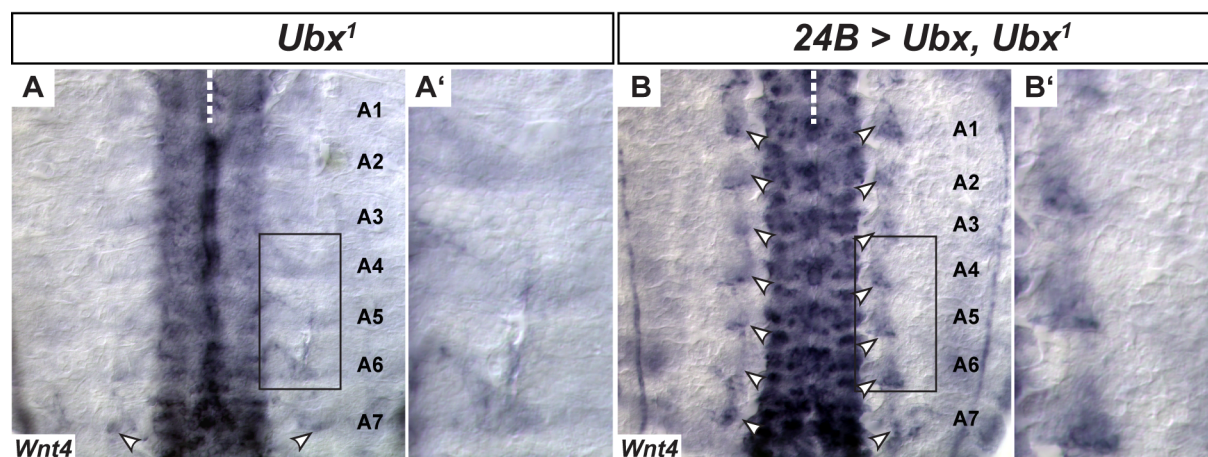


Abbildung 21: Muskelspezifische Expression von *Ubx* kann die Expression von *Wnt4* in *Ubx¹* Mutanten retten. Gezeigt sind flach präparierte Embryonen des späten Stadium 14 nach *in situ* Hybridisierungen mit der *Wnt4*-Sonde in *Ubx¹* (Kontrolle) und nach Expression von *Ubx* in allen Muskeln im *Ubx¹* mutierten Hintergrund (*24B > Ubx, Ubx¹*). Die Pfeilköpfe deuten auf eine ektopische Expression von *Wnt4* in der ventralen Muskelgruppe hin. Die Rechtecke geben die Bereiche des Vergrößerungsausschnitts auf der Rechten eines jeden Bildes an. Anterior ist oben, die unterbrochene Linie deutet die ventrale Mittellinie an. (A-B) In *Ubx¹* wird *Wnt4* in der ventro-lateralen Muskelgruppe nicht exprimiert. Lediglich in posterioren Segmenten (A6 und A7) ist in wenigen Fällen ein Signal zu erkennen (A, A'). Nach Expression von *Ubx* in allen Muskeln mit *24B Gal4* ist die *Wnt4* Expression in ventro-lateralen Muskeln aller Segmente zu erkennen (B, B').

Analysen der *Ubx*-Expression in den verschiedenen Rettungsbedingungen zeigen die gewebsspezifische Expression von *Ubx* mit den verschiedenen Treiberlinien (**Abbildung 22**). Vermutlich lassen sich durch die ubiquitäre *Ubx*-Expression in *Ubx¹*-mutanten Hintergrund keine höheren Rettungsraten erhalten, da die endogene *Ubx*-Expression mit den verfügbaren Treiberlinien nicht adequat rekapituliert werden kann

(Abbildung 22 A, F). Bei der Verwendung von *Act5C*-Gal4 sind die Expressionsspiegel in späten Stadien im VNS und in den Muskeln im Vergleich zur Kontrolle (*w¹¹¹⁸*) deutlich geringer (Abbildung 22 A, F).

Zusammenfassend deutet dies auf eine duale Rolle von *Ubx* in Neuronen und Muskeln hin, die auf einer exakten Regulation von *Ubx* beruht.

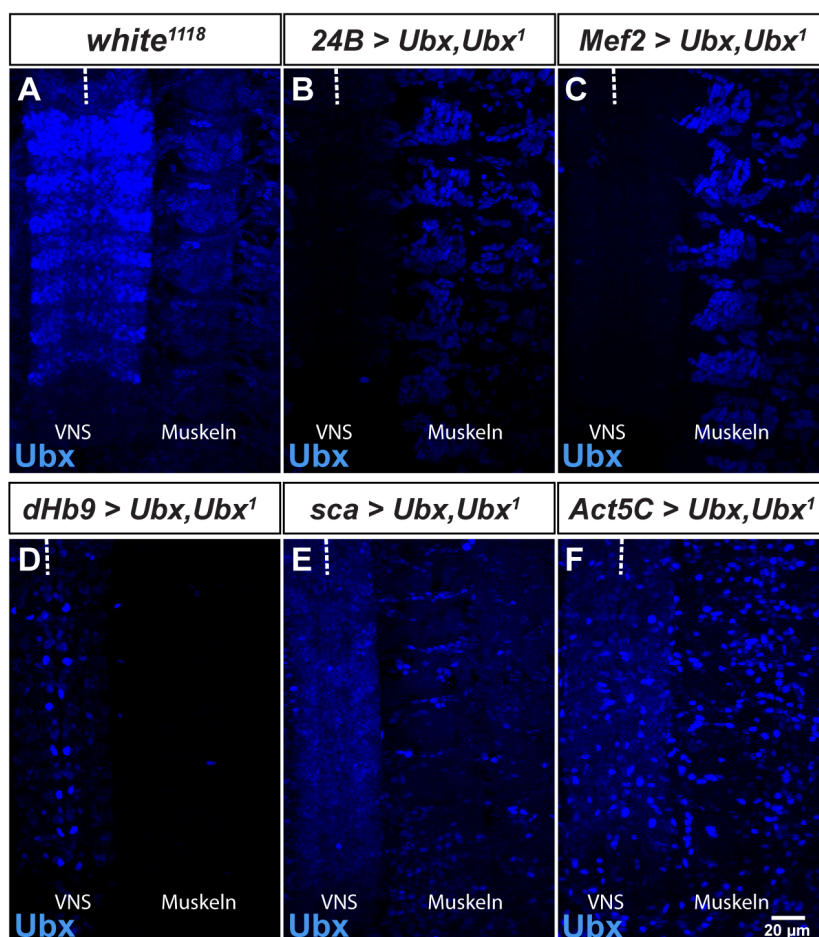


Abbildung 22: Expressionsanalyse von Ubx in den unterschiedlichen Rettungssituationen.

Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-Ubx (blau) gefärbt wurden. Es wurden Maximalprojektionen der Ebenen des VNS und der Muskeln erstellt. Die untersuchten Genotypen sind über jeder Bildspalte angegeben. Anterior liegt oben. Die unterbrochene Linie markiert die Mittellinie. (A) Unter Kontrollbedingungen wird Ubx in späten Stadien verstärkt im VNS exprimiert. In Muskeln ist die Expression schwächer. (B und C) Wird die Ubx Expression in Muskeln im *Ubx¹* mutierten Hintergrund zurück gebracht, so ist eine Expression in Muskeln zu erkennen, nicht jedoch im VNS. (D) Wird Ubx mit *dHb9*-Gal4 im *Ubx¹* mutierten Hintergrund exprimiert, so ist die Expression lediglich in bestimmten Neuronen im VNS zu erkennen, nicht jedoch in Muskeln. (E) Wird Ubx mit *sca*-Gal4 im *Ubx¹* mutierten Hintergrund exprimiert, so ist eine breite Expression im VNS zu erkennen. In der Peripherie sind einige epidermale Zellen in der Fokusebene. (F) Mit *Act5C*-Gal4 ist eine schwache Ubx Expression im Nervensystem und in den Muskeln zu erkennen. Es sind einige epidermale Zellen in der Fokusebene zu erkennen.

3.2.8 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine Interaktion von *Ubx* und *arm in vivo* untersucht. Hierbei wurde eine neue Funktion von *Ubx* für die Abdomen-typische Ausbildung der neuromuskulären Kontakte mit den ventro-lateralen Muskeln (VL1, VL2, VL3 und VL4) gefunden. Es zeigte sich, dass *Ubx* sowohl mit dem in diesem Prozess involvierten Wnt4- als auch mit dem NetB-Signalweg interagiert. Dabei kontrolliert *Ubx* die Expression der Liganden *Wnt4* und *netB*, sowie einem potentiellen extrazellulären Modifikator des *Wnt4* Signals (*Dsulf1*) während der frühen Phase der Wegfindungsprozesse innerhalb dieser Muskeln. Gleichzeitig hat *Ubx* einen Einfluss auf die neuronale Interpretation dieser Signale innerhalb der jeweiligen RP-Neurone. Dies konnte durch Rettungsversuche untermauert werden, bei welchen eine Rettung der *Ubx*-Mutante nur nach simultaner Expression von *Ubx* in Neuronen und Muskeln erfolgte.

3.3 Charakterisierung des GW-Neurons im Hinblick auf die *Ubx* vermittelte Apoptose

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein weiterer Aspekt des Einflusses von *Ubx* auf das neuro-muskuläre System während der späten Neurogenese untersucht. *Ubx* kontrolliert die Apoptose einiger Neurone, welche hauptsächlich als Motoneurone kategorisiert wurden (Rogulja-Ortmann et al., 2007; Rogulja-Ortmann et al., 2008). Bei einem dieser Neurone handelt es sich um das dem NB7-3 entstammende GW-Neuron, welches durch *Ubx* in T3-A7 in der späten Embryogenese stirbt (Higashijima et al., 1996; Rogulja-Ortmann et al., 2008). Für dieses Neuron konnte bisher nicht der Beweis erbracht werden, dass es sich um ein Motoneuron handelt. Zwar konnte gezeigt werden, dass es sich dahingehend differenziert, dass es ein prominentes Axon ausbildet (Bossing et al., 1996), aber es konnte nicht demonstriert werden, welche Funktion das GW-Neuron besitzt. Es wurde bereits spekuliert, ob es sich um ein spät differenzierendes Motoneuron handelt (Bossing et al., 1996). Um die Apoptose-induzierende Wirkung von *Ubx* während der Etablierung neuromuskulärer Netzwerke genauer zu charakterisieren, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, dieses Neuron in seiner Morphologie in den Segmenten T1 und T2 zu beschreiben um damit Rückschlüsse auf seine Funktion und den Grund seiner abdominalen Apoptose ziehen zu können.

3.3.1 Morphologische Charakterisierung der GW-Projektion mittels Flybow

In dieser Arbeit wurde *Flybow1.1* (Hadjieconomou et al., 2011) zusammen mit *eagle-Gal4* (*eg-Gal4*) (Dittrich et al., 1997) verwendet, um das GW-Neuron als einzelne Zelle innerhalb des Zellverbandes darzustellen und die axonale Projektion zu verfolgen. Das *eg*-Muster eignet sich sehr gut für diese Analyse, da es in nur vier Neuroblastenzelllinien exprimiert wird, welches den NB7-3 und seine Nachkommen umfasst (Dittrich et al., 1997; Higashijima et al., 1996). Durch den Zeitpunkt des Hitzeschocks wurden gezielt die frühen Nachkommen des NB7-3 (EW1 und GW) markiert. Nach einer Entwicklung in späte Stadien (16-18 h nach Ablage) wurden die Embryonen mit anti-GFP und anti-Fas2 gefärbt und jene selektiert, die ein Rekombinationsereignis innerhalb des NB7-3 GW-Neurons in T1 und T2 aufwiesen. Mit dieser Methode konnten GW-Neurone markiert werden. Es zeigte sich, dass in diesem späten Entwicklungsstadium, die thorakalen GW-Axone sowohl in T1, als auch T2 das ventrale Bauchmark verlassen, um in den Segmentalen Nerv (SN) zu projizieren. An dieser Stelle endete die Projektion interessanterweise (**Abbildung 23 A', B'**, siehe Pfeilköpfe). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt sind die neuromuskulären Kontakte vollständig aufgebaut und die Ausbildung funktionaler Synapsen beginnt, was sich in ersten Kontraktionen des Embryos äußert (Crisp et al., 2008; Peraanu et al., 2007; Prokop, 1999).

In abdominalen Segmenten konnten in seltenen Fällen einzelne Projektionen beobachtet werden. Dies war aufgrund der dort induzierten Apoptose des GW-Neurons ungewöhnlich. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass bereits im späten Stadium 16 etwa 80-90 % der analysierten Hemisegmente ein für den pro-apoptotische Faktor Dcp-1 positives GW-Neuron besitzen oder es sich bereits nicht mehr feststellen lässt (Geyer et al., 2015) (siehe auch **Abbildung 28 und 29**). Die beobachteten abdominalen Projektionen reichten an den ventralsten Bereich der Muskeln heran.

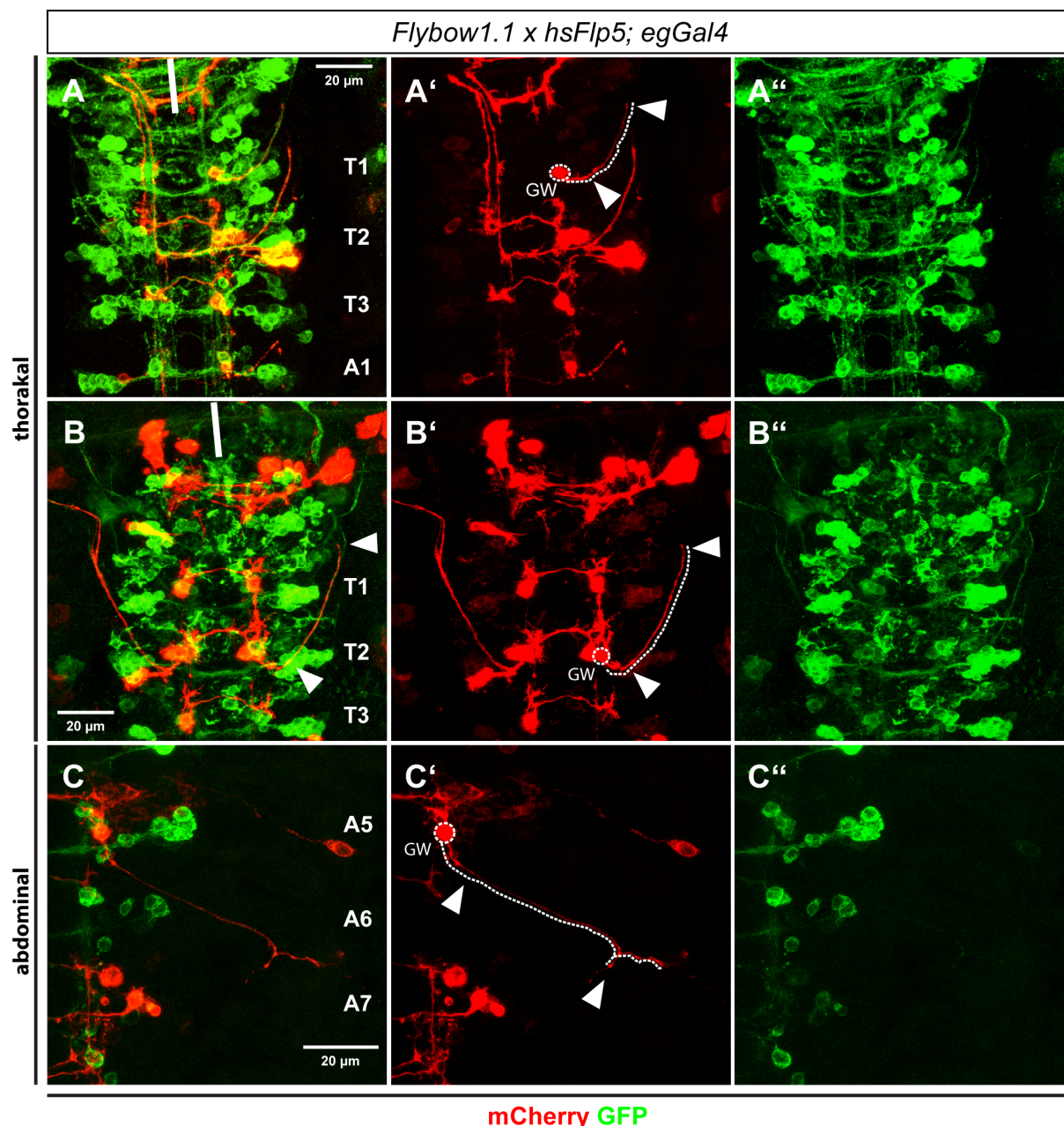


Abbildung 23: Visualisierung des GW-Projektionsmusters mittels Flybow.

(A-D') Gezeigt sind flach präparierte Embryonen im frühen Stadium 17, welche mit anti-GFP (grün) und anti-mCherry (rot) gefärbt wurden. Das GW-Neuron konnte eindeutig durch seine Lage innerhalb des NB7-3 Zellverbandes identifiziert werden. Die weiße Linie verfolgt die axonale Projektion der eingekreisten Zelle. Pfeilköpfe markieren diese Projektion und ihren Endpunkt. Die weiße Linie markiert die ventrale Mittellinie. Anterior liegt oben. (A-B'') Gezeigt sind exemplarische Projektionen für T1 und T2. In beiden Fällen ist zu erkennen, dass das GW-Neuron ein deutliches Axon generiert, welches das ZNS über den SN verlässt, dort aber stoppt, ohne den Innervationsbereich der ventralen Muskeln zu erreichen. (C-C'') Gezeigt ist eine exemplarische abdominale Projektion eines GW-Neurons, bevor es durch programmierten Zelltod stirbt. Zu erkennen ist, dass das Axon das ZNS in die Peripherie verlässt, um sich am Ende zu gabeln.

Um den Zusammenhang zwischen GW-Projektion und Muskellokalisierung genauer zu untersuchen, wurden Embryonen, welche mit dem Flybow-Protokoll behandelt wurden, neben anti-GFP und anti-mCherry zusätzlich mit anti-Fas2 und anti-Myosin angefärbt (Abbildung 24). Wie bereits zuvor beschrieben, zeigte sich erneut für T2 eine

Projektion, welche das ventrale Bauchmark verlässt, dann aber im Segmentalnerv endet (**Abbildung 24 A**). Der Endpunkt lag dabei deutlich vor dem Punkt des Innervationsorts des ventralsten Ventral-Oblique Muskel VO2, was mit Fas2 verfolgt werden konnte (**Abbildung 24**). In dem gleichen Präparat wurde außerdem das T3 GW der rechten Seite getroffen und es konnte dessen Projektion verfolgt werden. Ähnlich wie die in **Abbildung 23** gezeigte abdominale Projektion reichte diese Projektion, verglichen mit der in T2, etwas weiter bis kurz vor den Bereich der Muskelinnervation der Ventral-Oblique Muskelgruppe (**Abbildung 24 A, D**).

Zusammenfassend ließ sich mit der gezeigten Methode das GW-Neuron im späten Embryo visualisieren und verfolgen. Allerdings konnte kein offensichtliches Muskelziel identifiziert werden.

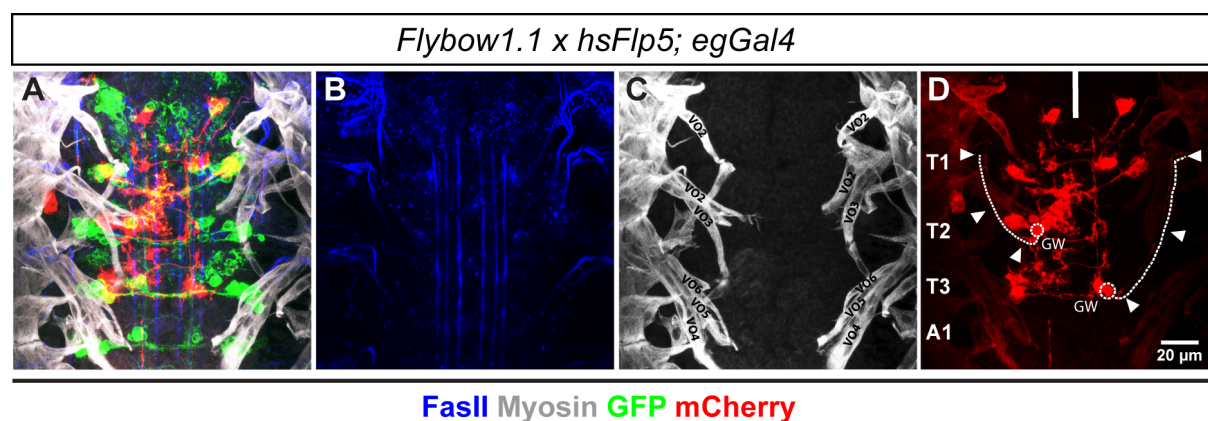


Abbildung 24: Visualisierung der GW-Projektion mittels Flybow und neuromuskulären Markern zeigt kein Innervationsziel während der Embryogenese.

Gezeigt ist ein flach präparierter Embryo im frühen Stadium 17, welcher mit anti-GFP (Ausgangsfluorophor von Flybow 1.1, grün), anti-mCherry (Fluorophor nach Rekombination, rot), anti-Fas2 (Motoneurone, blau) und anti-Myosin (Muskeln, grau) gefärbt wurde. Das GW-Neuron konnte eindeutig durch seine Lage innerhalb des NB7-3 Zellverbandes identifiziert werden. Anterior liegt oben. Die unterbrochene Linie verfolgt die axonale Projektion der eingekreisten Zelle. Pfeilköpfe deuten diese Projektion und ihren Endpunkt an. Die weiße Linie markiert die ventrale Mittellinie. Zu sehen sind jeweils eine Projektion für T2 und eine für T3. Die T2 Projektion endet innerhalb des Nerven, ohne das Innervationsfeld der ventralsten Muskeln (ventral-oblique Muskeln (VO 2-6) zu erreichen. Die Projektion in T3 ist länger, jedoch wird auch hier das ventrale Innervationsfeld nicht erreicht.

Da sich für den Embryo kein klares Muskelziel ermittelt ließ, lag es nahe, die larvale Situation zu überprüfen. Hierfür wurden Embryonen nach dem Flybow-Protokoll behandelt und mittlere bis späte Stadium 16-Embryonen nach markierten thorakalen GW-Zellen selektiert (**Abbildung 25 A-A''**). Diese Embryonen konnten sich danach weiter bis in die L1-Larve oder die frühe L3-Larve entwickeln. Die GW-Neurone wurden dann entweder als Präparationen des ZNS (L1) oder als Filetpräparationen (L3)

analysiert. Es war feststellbar, dass das GW-Neuron bis in diese Larvalen Stadien überlebte (**Abbildung 25 B-C''**). Allerdings konnte auch in diesen Entwicklungsstadien keine Projektion beobachtet werden, welche nicht im Segmentalnerv endete. Mit dem hier beschriebenen Versuchsprotokoll war es nicht möglich, spätere Stadien zu untersuchen, da die Expression des *eg-Gal4* Musters in späteren Stadien Veränderungen unterworfen war, die ein Verfolgen des GW unmöglich machten.

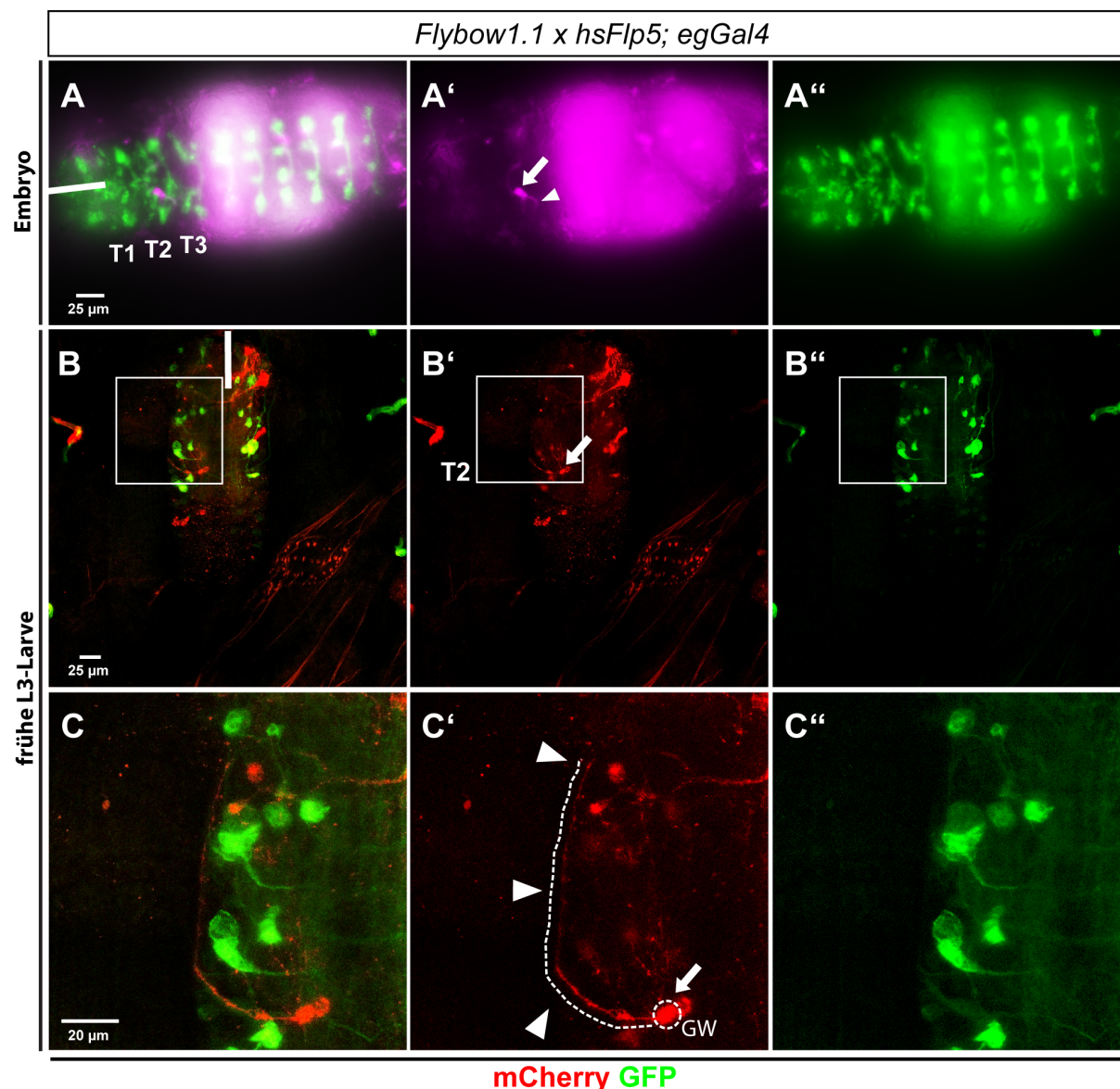


Abbildung 25: Die Verfolgung der GW-Projektion in larvale Entwicklungsstadien unter Nutzung von Flybow zeigt keine Innervation von Muskeln.

(A-A') Gezeigt ist ein lebender Embryo im Stadium 16 in welchem die Fluoreszenz von GFP (grün) und mCherry (magenta) detektiert wurde. Dieser Embryo konnte sich anschließend weiter bis zur frühen L3-Larve entwickeln, welche in (B-C'') dargestellt ist. Das GW-Neuron konnte eindeutig durch seine Lage innerhalb des NB7-3 Zellverbandes identifiziert werden. Anterior liegt links. Der weiße Pfeil markiert das GW-Neuron. Pfeilköpfe deuten dessen Projektion an. Die weiße Linie deutet die ventrale Mittellinie an. (B-C'') Flachpräparat einer frühen L3-Larve, welche sich aus dem in (A) gezeigten Embryo entwickelt hat. Anterior liegt oben. Die unterbrochene Linie verfolgt die axonale Projektion der eingekreisten Zelle. Pfeilköpfe markieren diese Projektion und ihren Endpunkt. Die weiße Linie markiert die ventrale Mittellinie. Das GW-Neuron überlebt bis in larvale Stadien. Auch hier zeigt sich eine Projektion, welche das Nervensystem verlässt, aber vor Erreichen der Innervationsstellen der Muskeln endet.

Als nächstes wurde überprüft, ob das GW-Neuron positiv für motoneuronale Marker ist. Motoneurone in *D. melanogaster* erhalten durch Kontakt mit ihrem Zielmuskel ein retrogrades *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-Signal, was zu einer Anreicherung von phosphoryliertem *Mothers Against Decapentaplegic* (pMad) innerhalb der Nuklei aller Motoneurone (Heckscher et al., 2014; McCabe et al., 2003) und einiger neuro-peptiderger Neurone (Allan et al., 2003) führt. Weiterhin nutzen Motoneurone den Neurotransmitter Glutamat (Mahr and Aberle, 2006). Basierend darauf wurde in späten Embryonen diese Marker innerhalb des GW-Neurons analysiert. Hierfür wurden alle Eg-exprimierenden Zellen mit GFP markiert. Weiterhin wurde anti-Hb verwendet, um das EW1- und das GW-Neuron innerhalb dieses Zellverbandes zu identifizieren. Eine parallele Färbung gegen anti-pMad markierte alle Motoneurone (Heckscher et al., 2014). Es zeigte sich, dass das GW-Neuron in T1 und T2 nur sehr schwach positiv für pMad war (**Abbildung 27 A-B''**). Die detektierten Proteinspiegel innerhalb des GW-Neurons waren zwar etwas stärker als die des benachbarten EW1-Interneurons, aber deutlich schwächer als die der umgebenden Motoneurone (**Abbildung 27 B'**).

Bei dem vesikulären Glutamatttransporter (vGlut) handelt es sich um ein Protein, welches jedes glutamaterge Neuron markiert und damit auch alle Motoneurone (Mahr and Aberle, 2006). Eine Gal4 Linie im regulatorischen Bereich des Lokus des *vGlut* Gens, welche als *OK371* Gal4 bezeichnet wird, kann als Reporter für die Expression von vGlut herangezogen werden (Mahr and Aberle, 2006). Die verwendete Linie enthielt bereits ein *UAS-CD8::GFP* zur Visualisierung dieser Neurone. Zur Verstärkung des Signals wurde diese Linie zusätzlich mit *UAS-CD4::tdGFP* gekreuzt und mit anti-GFP, anti-Eg und anti-Hb gefärbt. Die Analyse später Embryonen ergab keine Doppelfärbung von GFP und Eg innerhalb des NB7-3 Zellverbandes (**Abbildung 27 C-D''**).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass es sich bei dem GW-Neuron weder um eine neuro-peptiderge Zelle, noch um ein funktionales Motoneuron handelt. Sein Axon verlässt zwar das ZNS, endet aber innerhalb des SN.

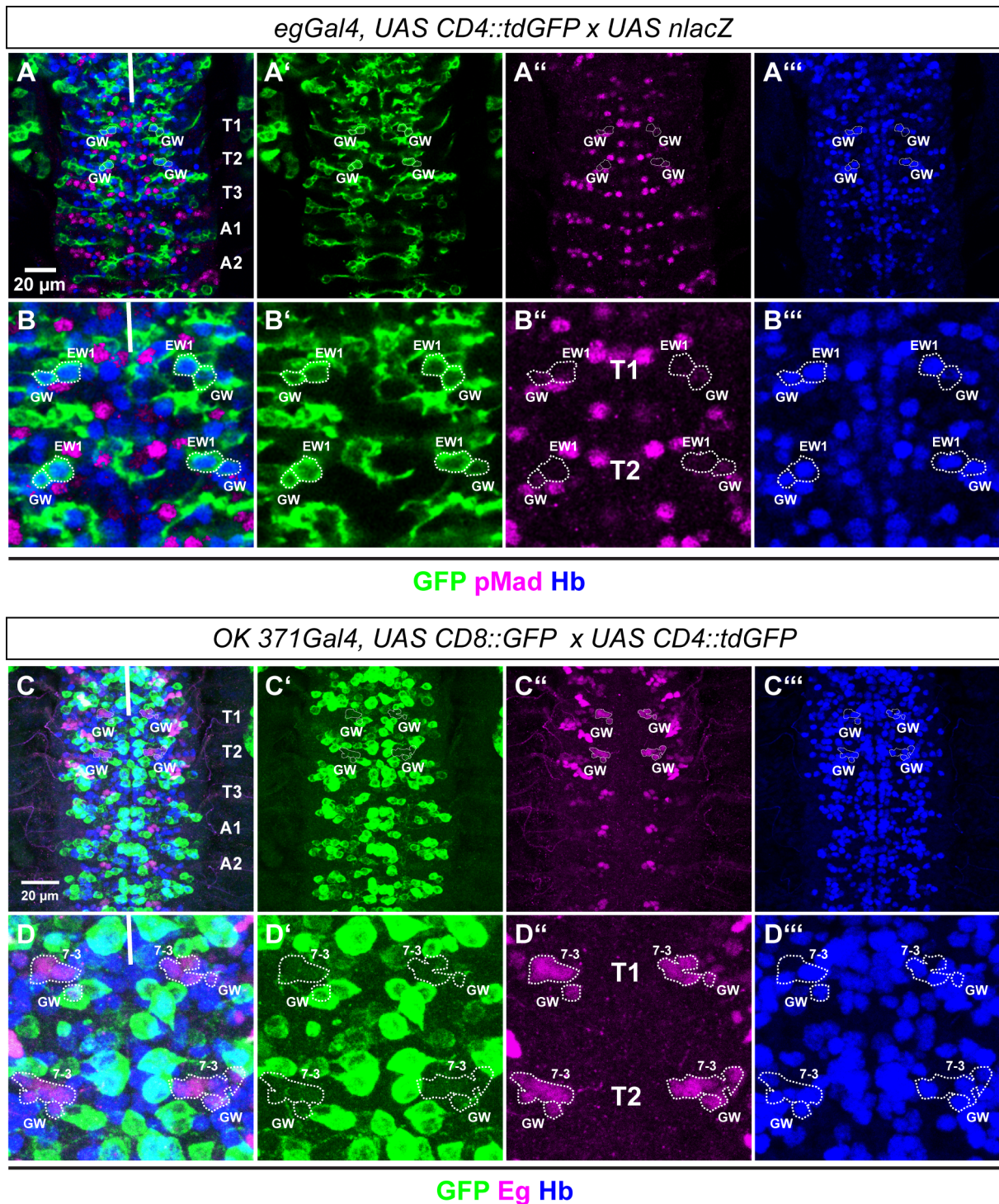


Abbildung 27: Das GW-Neuron ist negativ für Marker von Motoneuronen.

Gezeigt sind flach präparierte ZNS von Embryonen im frühen Stadium 17. Die weiße Linie markiert die ventrale Mittellinie. Die entsprechenden Genotypen sind über jeder Bildspalte gezeigt. Anterior ist oben. (A-B'') Gefärbt wurde mit anti-GFP (Marker für den NB7-3 Zellverband, grün) und anti-pMad (Marker für Motoneurone, magenta) und anti-Hb (Marker für EW1 und GW-Neuron, blau). Das GW-Neuron ist schwach positiv für pMad. Das Signal liegt deutlich unter dem der umliegenden Motoneurone (B'). (C-D'') Gefärbt wurde mit anti-GFP (Marker für Motoneurone, grün) und anti-Eg (Marker für den NB7-3 Zellverband, magenta) und anti-Hb (Marker für EW1- und GW-Neuron, blau). Der NB7-3 Zellverband, welcher das GW-Neuron umfasst, ist negativ für das GFP-Signal des *OK371* Gal4 Treibers. Das GW-Neuron ist mit hoher Wahrscheinlichkeit kein klassisches Motoneuron.

3.3.3 Charakterisierung der GW-Projektion nach Reduktion von Ubx

Da bisher keine Kategorisierung für das GW-Neuron vorgenommen werden konnte, wurde untersucht, wie sich das GW-Neuron verhält, wenn es länger als vorgesehen überlebt. Hierfür wurde ein RNAi-basierter Ansatz verwendet. Es war bekannt, dass ein Ausfall der *Ubx*-Funktion zu einem Überleben des GW-Neurons führt (Geyer et al., 2015; Rogulja-Ortmann et al., 2008). Um die Morphologie des GW-Neurons nach Überleben bestimmen zu können, wurde eine Kombination aus *eg-Gal4* und membranständigem *UAS-CD4::tdGFP* verwendet. Innerhalb dieses Musters wurde *Ubx* durch *UAS-Ubx RNAi_{III}* depletiert. Zunächst wurde die Effizienz dieses Knock-downs verifiziert. In frühen Stadium 17 Embryonen sind unter Kontrollbedingungen (*eg-Gal4*, *UAS-CD4::tdGFP* x *UAS-nlacZ*) in T3 bis A7 lediglich 11 % (n=144) der Hemisegmente negativ für eine Expression von aktivierter Dcp-1 als Marker für Apoptose (**Abbildung 28 A, A'** und **C**). Nach *Ubx* Depletion mittels *UAS-Ubx RNAi* sind in T3 bis A7 74 % (n=168) der Hemisegmente negativ für aktivierte Dcp-1. Das heißt, das GW-Neuron überlebt vermehrt nach Reduktion von *Ubx* (**Abbildung 28 B, B', C**). Diese Daten decken sich mit bereits beschriebenen Daten für verschiedene *Ubx*-Allele (Geyer et al., 2015; Rogulja-Ortmann et al., 2008).

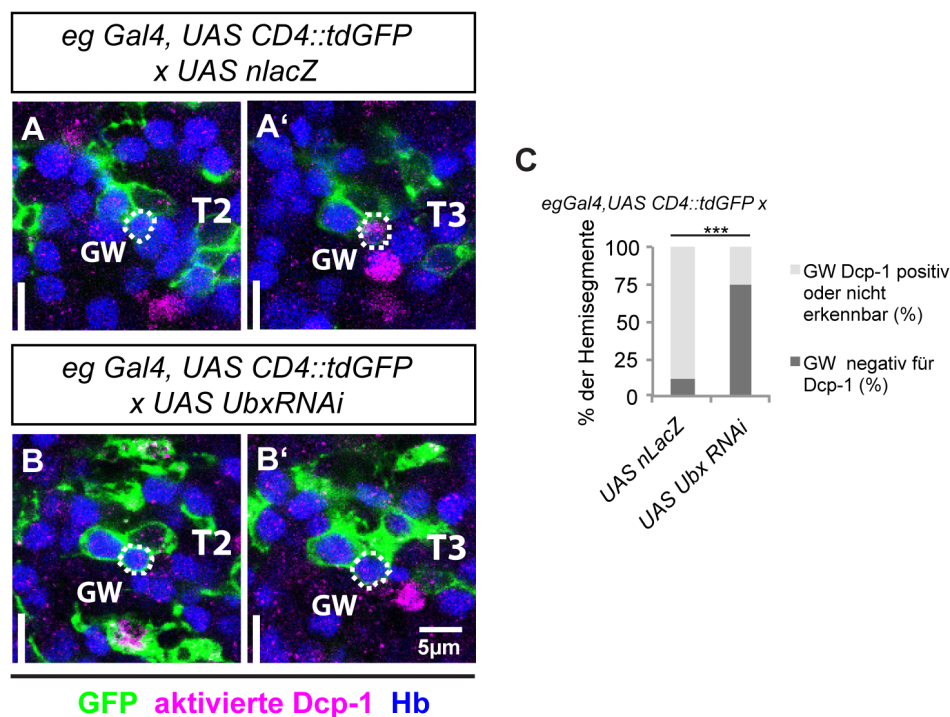


Abbildung 28: Depletion von Ubx im GW-Neuron verhindert dessen programmierten Zelltod.

(A-B') Zeigt sind flach präparierte ZNS von Embryonen im späten Stadium 16. Anterior ist oben. Die weiße Linie markiert die ventrale Mittellinie. Die entsprechenden Genotypen sind über jeder Bildspalte gezeigt. Gefärbt wurde mit anti-GFP (Marker für den NB7-3 Zellverband, grün), anti-aktivierte Dcp-1 (Marker für Apoptose, magenta) und anti-

Hb (Marker für EW1 und GW-Neuron, blau). Unter wildtypischen Bedingungen ist das GW-Neuron in T2 negativ für aktivierte Dcp-1 (A). In T3 bis A7 ist es hingegen positiv für aktivierte Dcp-1 oder durch Apoptose entfernt (A'). (B-B') Nach Reduktion des Ubx-Spiegels ist nur eine verminderte Rate an aktivierte Dcp-1 positiven GW-Neuronen detektierbar und das T3-GW ist frei von aktivierte Dcp-1-Signal (B'). (C) Quantifizierung der Effekte der Reduktion von Ubx im Hinblick auf die Ubx vermittelte GW-Apoptose. Die Reduktion von Ubx mit Hilfe von RNAi führt zu einer signifikant erhöhten Rate an aktivierte Dcp-1-negativen GW-Neuronen in T3 bis A7. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. *** $p \leq 0.005$. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: *eg-Gal4, UAS CD4::tdGFP > UAS-nlacZ*: n=144, *eg-Gal4, UAS-CD4::tdGFP > UAS-Ubx RNAi*: n=168.

Als nächstes wurde der Einfluss des Überlebens auf das Auswachsen des GW-Axons untersucht. Als Vergleich zum ektopischen Überleben des GW-Neurons nach Depletion von Ubx wurde der Caspase-Inhibitor des Baculovirus p35 verwendet (Zhou et al., 1997). Unter Kontrollbedingungen lässt sich in abdominalen Segmenten maximal ein Axon pro Hemisegment beobachten (**Abbildung 29 A**). Dieses Axon kann dem NB2-4 MN zugeordnet werden (Rogulja-Ortmann et al., 2008; Schmidt et al., 1997). Nach ektopischem Überleben des GW-Neurons sowohl durch UAS-Ubx RNAi oder UAS-p35 konnten vermehrt zwei Axone pro Hemisegment beobachtet werden, wobei eines davon dem überlebenden GW-Neuron zugeordnet werden konnte (**Abbildung 29 B und C**, weiße Pfeilköpfe). Die Quantifizierung dieser Prozesse ergab für die Kontrolle lediglich 3,6 % (n=140) an GW-Axonen, welche das ZNS in abdominalen Segmenten verließen (**Abbildung 29 D**). Nach Depletion von Ubx zeigten 34,6 % (n=130) der abdominalen Hemisegmente ein zusätzliches Axon. Diese Zahlen unterschieden sich signifikant von der Kontrolle. Nach Inhibition der Apoptose mit UAS-p35 zeigten 32,7 % der abdominalen Hemisegmente ein zusätzliches Axon. Auch dieser Datensatz war signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Die Datensätze der Ubx-Depletion im Vergleich zur Inhibition der Apoptose waren hingegen nicht signifikant unterschiedlich (**Abbildung 29 D**). Dass es nach Depletion von Ubx innerhalb des NB7-3 Zellstammbaums zu einer Reduktion von Ubx kam, wurde durch Färbung mit anti-Ubx verifiziert (**Abbildung 29 E**).

Zur Charakterisierung der ektopisch überlebenden GW-Neurone wurden die pMad Spiegel untersucht. Hierfür wurde nach Depletion von Ubx mit *eg-Gal4* späte Embryonen mit anti-pMad gefärbt. Es war ein deutliches Axon zu erkennen, welches sich an seinem Ende gabelte (**Abbildung 29 F**, vergleiche auch mit **Abbildung 23 C'**). Trotz dieses deutlichen Axons waren innerhalb der GW-Neurone nur sehr schwache pMad-Spiegel zu detektieren, welche deutlich unter dem der umliegenden pMad positiven Motoneurone lagen (**Abbildung 29 F'**). Dies deutet darauf hin, dass das ektopische Überleben, verbunden mit dem Auswachsen des Axons in die Peripherie nicht dazu führt, dass das

Neuron dort einen Muskel innerviert. Auch wird anscheinend kein abnormales Ziel gesucht.

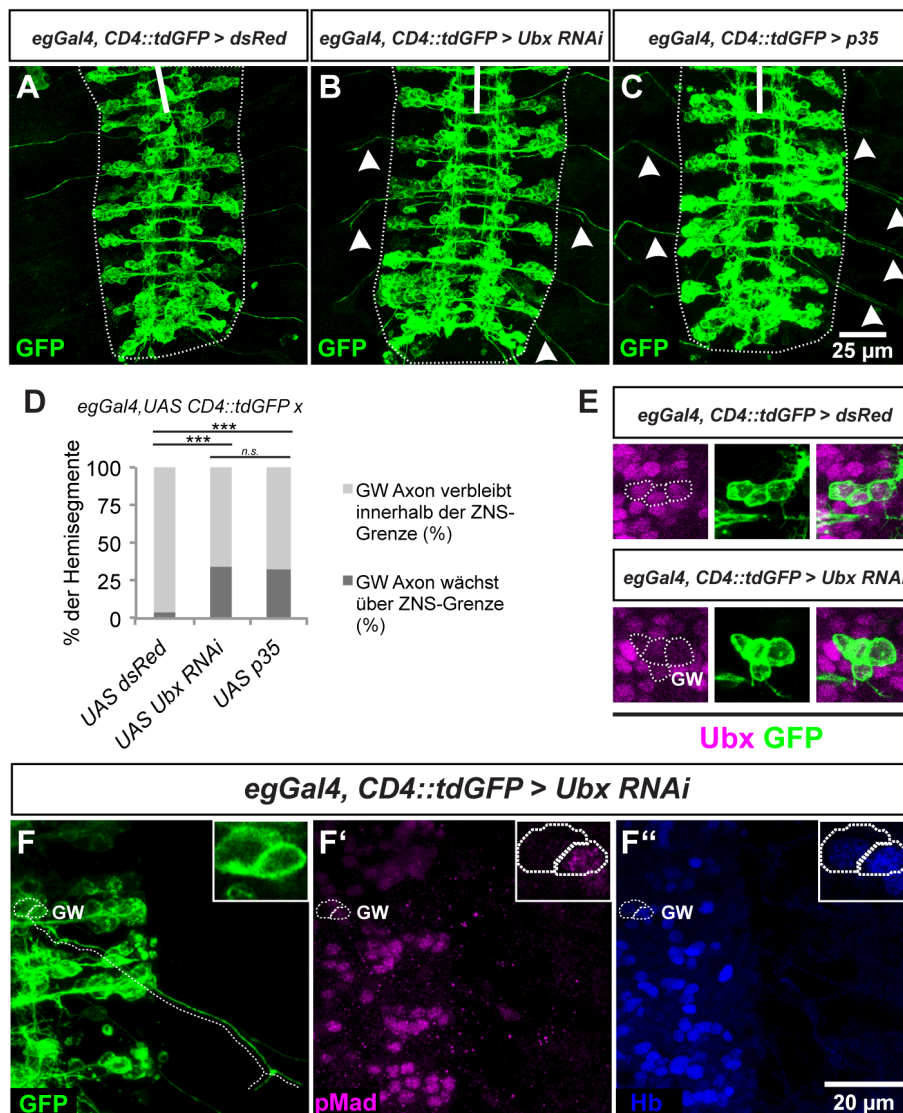


Abbildung 29: Die Reduktion von *Ubx* im GW-Neuron führt zu einer Erhaltung des Axons, jedoch zu keiner Erhöhung der pMAD-Level.

(A-C) Gezeigt sind abdominale Ausschnitte flach präparierter Embryonen im frühen Stadium 17. Die weiße Linie markiert die ventrale Mittellinie. Die entsprechenden Genotypen sind über jeder Bildspalte gezeigt. Anterior ist oben. Gefärbt wurde mit anti-GFP (Marker für den NB7-3 Zellverband, grün). Unter Kontrollbedingungen sind die Axone des NB2-4 Neurons zu erkennen und keine Axone des GW-Neurons (A). Nach Reduktion von *Ubx* durch UAS-*Ubx RNAi* oder Expression eines UAS-*p35* Konstrukts (ein Inhibitor der Caspase-vermittelten Apoptose) mit *eg-Gal4* sind vermehrt zwei Projektionen pro Hemisegment zu beobachten, wovon eine durch das überlebende GW-Neuron generiert wird (weiße Pfeilköpfe in (B) und (C)). (D) Quantifizierung der Überschreitung der ZNS-Grenze durch das GW-Axon. Ausgewertet wurden die Segmente A1 bis A7. Die RNAi vermittelte Reduktion von *Ubx* führt zu einer signifikant erhöhten Rate an GW-Axonen in A1 bis A7, welche die ZNS Grenze überschreiten. Eine vergleichbare Rate ist nach Blockierung des Zelltodes durch Expression von UAS *p35* zu beobachten. Kategorisierte Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf ihre statistische Unabhängigkeit geprüft. *** $p \leq 0.005$, n.s., nicht signifikant. Mit n ist die Anzahl der ausgewerteten Hemisegmente angegeben: *eg-Gal4, UAS-CD4::tdGFP > UAS dsRed*: n=140, *eg-Gal4, UAS-CD4::tdGFP > UAS-Ubx RNAi*: n=130, *eg-Gal4, UAS-CD4::tdGFP > UAS-p35*: n=146. (E) Kontrollfärbung zur Bestätigung reduzierter *Ubx*-Level nach Expression von UAS-*Ubx RNAi*. Gezeigt sind exemplarische NB7-3 Zellcluster in abdominalen Segmenten. Die *Ubx* Spiegel innerhalb der GFP-positiven Zellen sind deutlich reduziert. (F-F'') Gezeigt sind abdominale Ausschnitte flach präparierter Embryonen im frühen Stadium 17 nach Reduktion von *Ubx* mit UAS-*Ubx RNAi*. Anterior ist oben. Gefärbt wurde mit anti-GFP (grün), anti-pMad (magenta) und anti-Hb (blau). Nach Überleben des GW-Neurons sind keine hohen pMad-Spiegel in dieser ektopischen Zelle detektierbar, was darauf hindeutet, dass kein Kontakt mit einem Muskel erfolgt ist.

3.3.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Rolle von *Ubx* auf den programmierten Zelltod des GW-Neurons untersucht. Mit Hilfe von *Flybow* konnten GW-Neurone in T1 und T2 auf Einzelzellebene markiert und ihre Axone verfolgt werden. Es konnte sowohl im Embryo als auch in der Larve kein klares Ziel dieser Projektion identifiziert werden. Anschließende Markeranalysen zeigten, dass es sich bei dem GW-Neuron weder um eine neuro-peptiderge Zelle, noch um ein funktionales Motoneuron handelt. Auch ein ektopisches Überleben in abdominalen Segmenten nach Depletion von *Ubx* führte zu keiner Expression motoneuronaler Marker, obwohl ein Axon in die Peripherie gesendet wurde.

4 Diskussion

4.1 Protein-Interaktionen als eine Möglichkeit Hox-Funktionen zu spezifizieren

Hox-Proteine stellen eine evolutionär hoch konservierte Gruppe an Transkriptionsfaktoren dar, die diverse Entwicklungsprogramme koordinieren (Pearson et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, auf welche Weise der Transkriptionsfaktor *Ubx* in der Lage ist, in unterschiedlichen Zelltypen spezifische Entwicklungsschicksale zu vermitteln. Beispielsweise wird *Ubx* in allen Nachkommenzellen des NB7-3 (EW1-3 Interneurone und GW-Neuron) in T3 bis A7 exprimiert. Jedoch wird nur das GW-Neuron durch *Ubx* mittels Apoptose entfernt (Rogulja-Ortmann et al., 2008). Dieses Beispiel zeigt, wie zellspezifisch *Ubx* agiert. Die Zellspezifität stellt einen entscheidenden Aspekt der Funktionsweise von *Hox*-Genen dar. Bisher konnte jedoch noch nicht hinreichend geklärt werden, wie diese Spezifität vermittelt wird und innerhalb der verschiedenen Entwicklungskontexte reguliert ist. Einen auffallenden Aspekt hierbei stellt die Beobachtung dar, dass *in vitro* Hox-Proteine mit ihrer Homeodomäne nur relativ unspezifisch AT-reiche DNA-Sequenzen binden (Slattery et al., 2011a). Dies steht im starken Kontrast zu ihrer Aktionsweise *in vivo*, in welcher sie sehr gezielt Gene regulieren können (Hox Paradox) (Merabet and Lohmann, 2015; Pradel and White, 1998). Eine Möglichkeit der Regulation stellen zellspezifische Hilfsfaktoren dar, mit denen Hox-Proteine interagieren können und somit zeitlich und räumlich reguliert werden (Merabet and Lohmann, 2015; Slattery et al., 2011b). Diese Interaktion würde zellspezifische Antworten generieren und könnte die hohe Diversität erklären (Sánchez-Herrero, 2013). Trotz des Bedarfs an Informationen konnten bisher lediglich Hth und Exd als konkrete Hilfsfaktoren detaillierter charakterisiert werden (Chan et al., 1994; Jaw et al., 2000; Slattery et al., 2011a), welche nicht das vollständige Spektrum der *in vivo* beobachteten Hox-Wirkweise erklären können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels eines *Modifier*-Screens 18 potentielle neuronale Interaktionspartner von *Ubx* *in vivo* identifiziert (**Tabelle 23**) und von zehn die gewebsspezifische Expression untersucht (**Abbildung 6**). Hierbei zeigte sich, dass ein überwiegender Anteil der Kandidaten eine Expression innerhalb des sich entwickelnden Nervensystems aufwies. Darauf aufbauend konnten *Dbr*, *A2bp1* und *Arm*

als Interaktionspartner von Ubx in lebenden Zellen verifiziert werden (**Abbildung 7**). Alle Kandidaten erzeugten BiFC-Signale in Verbindung mit den Ubx Isoformen UbxIa, UbxIIa und UbxIVa. Mit der Exd-Interaktionsmutante Ubx^{UbdA} hingegen wurden lediglich stark reduzierte Fluoreszenzsignale beobachtet. Dies zeigt, dass es sich bei der UbdA-Domäne möglicherweise um eine zentrale Interaktionsdomäne von Ubx handelt, welche neben der Interaktion von Ubx mit Exd (Baëza et al., 2015; Merabet et al., 2007) auch für andere Hilfsfaktoren relevant ist (diese Arbeit). Die hier erzeugten Plasmide erlauben eine einfache Generierung von transgenen Fliegen. Für nachfolgende Studien wäre die Analyse der in der Zellkultur beobachteten Interaktionen in einem Organismus von Bedeutung. So könnten gewebsspezifische Unterschiede in der Interaktionsfähigkeit untersucht werden (Baëza et al., 2015; Hudry et al., 2011). Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben den bekannten Interaktionen von Ubx mit Hth und Exd eine große Zahl an neuen Interaktionspartnern zu erwarten ist. Weiterhin wurden neue Ansatzpunkte für zukünftige Studien geliefert und eine *in vivo* Zellkulturmethode etabliert, mit welcher neue Protein-Interaktionspartner identifiziert werden können.

4.2 Ubx hat eine duale Rolle während der Entwicklung des ventralen neuromuskulären Systems

Um den Einfluss von *Ubx* auf die Differenzierung von Neuronen zu verstehen, wurde die Rolle von *Ubx* während der Etablierung neuromuskulärer Kontakte untersucht. *Ubx* ist in somatischen Muskeln, sowie den innervierenden Motoneuronen aktiv (**Abbildung 9** (Hooper, 1986; Michelson, 1994; White and Wilcox, 1985)). Innerhalb des VL2 reguliert *Ubx* die Expression des Signalliganden *Wnt4*, welcher unter physiologischen Bedingungen sekretiert und von den RP-Neuronen detektiert wird, sowie *Dsulf1*, einem möglichen Modulator (**Abbildung 18**). Bei *Dsulf1* handelt es sich um eine Sulfatase, für welche bereits ein Zusammenhang mit der Sekretion und der Diffusion von Wnts gezeigt werden konnte. Hierbei hat *Dsulf1* sowohl Einflüsse auf kanonische, als auch auf nicht kanonische Signalwege (Ai et al., 2003; Dhoot et al., 2001; Fellgett et al., 2015; Kleinschmit et al., 2010; Tran et al., 2012). Auch innerhalb von VL3/4 kontrolliert *Ubx* die Expression eines Signalliganden. Hierbei handelt es sich um *NetB* (**Abbildung 18**), welches auf das RP3 eine attraktive Wirkung ausübt (Mitchell et al., 1996). Interessanterweise wurden die beschriebenen Faktoren bereits mit der

neuromuskulären Zielauswahl des RP5 beziehungsweise des RP3 während der Embryogenese in Verbindung gebracht (Inaki et al., 2007; Kolodkin, 1996; Kolodziej et al., 1996; Winberg et al., 1998).

Wnt4, *Dsulf1* und *netB* werden während des späten Embryonalstadiums 14 zu dem Zeitpunkt exprimiert, an welchem die Wachstumskegel der Neurone die Muskelfelder erreichen und beginnen, nach ihrem Zielmuskel zu suchen (**Abbildung 9 A-B**). Im Stadium 15 schließlich nehmen sie erste, instabile Kontakte mit den Muskeln auf, welche ab dem Stadium 16 sukzessive differenzieren und schließlich einen funktionale NMV am Ende der Embryogenese bilden (Prokop, 1999). Die beschriebene *Ubx*-vermittelte Regulation dieser Faktoren innerhalb der Muskeln würde bereits die in *Ubx*-Mutanten beobachteten Defekte erklären können (**Abbildung 10**). Interessanterweise war jedoch die muskelspezifische *Ubx*-Expression nicht ausreichend, die Innervationsrate von VL1 in *Ubx¹*-Mutanten zu retten, obwohl die Expression von *Wnt4* wiederhergestellt werden konnte (*24B*-Gal4 und *Mef3*-Gal4, **Abbildung 20 und Abbildung 21**). Dies deutet auf eine duale Rolle von *Ubx* in Muskeln und Neuronen hin.

Eine Studie von Dixit und Kollegen untersuchte den Einfluss von *Hox*-Genen auf die peristaltischen Bewegungen (Dixit et al., 2008). Bereits hier zeigten die Autoren, dass die ubiquitäre Expression von *Ubx* ausreichend ist, peristaltische Bewegungsmuster in thorakalen Segmenten zu induzieren, welche diese Art der Bewegungen normalerweise nicht aufweisen. Wurde die Expression hingegen nur in Muskeln induziert, waren diese peristaltischen Bewegungen nicht erkennbar. Dies deutet ebenfalls auf einen zusätzlichen Einfluss von *Ubx* innerhalb des ZNS hin (Dixit et al., 2008). Die neuronalen Effekte umfassen vermutlich die Kontrolle der korrekten Synapsenbildung, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, sowie wahrscheinlich weitere neuronale Schaltkreise (Mustergeneratoren), die auf komplexe und bisher nicht vollständig geklärte Art und Weise mit den Motoneuronen interagieren (Fushiki et al., 2016; Kiehn and Kullander, 2004; Kiehn et al., 2010). Eine interessante Frage wäre, wie sich die axonale Fehlleitung auf die Kontraktionsfähigkeit der Muskeln auswirkt. Dixit und Kollegen demonstrierten in diesem Zusammenhang, dass *Ubx¹*-Mutanten keine peristaltischen Bewegungen in A1 zeigen (Dixit et al., 2008). Es wäre daher zunächst wichtig zu untersuchen, wie sich der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Phänotyp in larvalen Stadien auf die Kontraktionsfähigkeit der VL-Muskeln auswirkt und ob sich Änderungen des Bewegungsmusters in A2-A7 feststellen lassen.

Die Daten legen deutlich eine kombinierte Rolle von *Ubx* in den signalgebenden Muskeln und den signalempfangenden Motoneuronen nahe. Rettungsexperimente von *Ubx*-Mutanten nach Expression von *Ubx* sowohl in Neuronen, als auch in Muskeln (*Act5C-Gal4*) waren dementsprechend in der Lage, die Innervationsrate des VL1 im Vergleich zu *Ubx*-Mutanten signifikant zu verbessern (**Abbildung 20**). Dass die Rettungsrate nicht noch besser ausfiel, ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die benötigte exakte zeitliche und räumliche Expressionsregulation von *Ubx* zurückzuführen, welche mit den aktuell möglichen Experimentalansätzen nicht präzise genug rekapituliert werden konnte (**Abbildung 22**).

4.3 Wie steuert Wnt4 die Synaptogenese?

Morphogene haben unabhängig von ihrer Rolle als Zellschicksalsdeterminanten auch Funktionen während der neuronalen Differenzierung (Marqués, 2005; Schnorrer and Dickson, 2004). Beispielsweise vermitteln die Hedgehog-, TGF- β - und Wnt-Signalwege Morphogengradienten in diversen Spezies und wurden zusätzlich im Zusammenhang mit verschiedenen axonalen Wegfindungs- und Synapsendifferenzierungsprozessen während der späteren Entwicklung in Verbindung gebracht (Charron et al., 2003; Inaki et al., 2007; Klassen and Shen, 2007; Lyuksyutova, 2003; Parker et al., 2006; Sato et al., 2006; Serpe and O'Connor, 2006; Strohlic et al., 2012). Im nachfolgenden soll die Rolle der Wnts in der neuronalen Entwicklung genauer beschrieben werden. Während der Embryogenese übernehmen verschiedene Wnts spezifische Aufgaben während der Spezifizierung von Neuroblasten (Deshpande et al., 2001; Loureiro and Peifer, 1998), der axonalen Wegfindung und der Synapsenbildung (Inaki et al., 2007; Klassen and Shen, 2007; Maro et al., 2009; Reynaud et al., 2015; Sato et al., 2006; Strohlic et al., 2012; Yoshikawa et al., 2003; Zheng et al., 2015). In späteren Entwicklungsphasen kontrollieren Wnts in *D. melanogaster* Aspekte der Morphologie und Physiologie an der larvalen NMV (Kerr et al., 2014; Packard et al., 2002) und besitzen sogar Einflüsse auf die Ausbildung des Langzeitgedächtnis (Chen et al., 2006; Tan et al., 2013). Innerhalb dieser Arbeit wurde die Rolle von Wnt4 während der embryonalen Entwicklung spezifischer neuromuskulärer Kontakte untersucht. In diesem Zusammenhang konnte *Ubx* als ein Regulator dieser Prozesse beschrieben werden. Auch in Vertebraten steuert

Wnt4 die Ausbildung der NMV (Strochlic et al., 2012). Wnt4 wird hierbei in den Muskeln während der Bildung erster Kontakte zwischen Motoneuron und Muskel verstärkt exprimiert und im Anschluss schrittweise herunter reguliert (Strochlic et al., 2012), was der in dieser Arbeit beobachteten Wnt4-Regulation in den VL Muskeln ähnelt. In diesem Zusammenhang wäre es aufschlussreich, ob auch in Vertebraten *Wnt4* unter Hox-Kontrolle steht.

Ein wichtiger Aspekt bei der Beschreibung von Wnt-Signalwegen stellt die Analyse der *Downstream*-Komponenten dar. Unterschiedliche Wnts können unterschiedliche Rezeptoren aktivieren, welche ihrerseits je nach Kontext verschiedene Signalweiterleitungsmoleküle rekrutieren. Man unterscheidet hierbei den kanonischen Signalweg (verwendet Arm und dTCF) von nicht kanonischen Signalwegen (Koles and Budnik, 2012). Die nicht kanonischen Signalwege können sehr divers sein, wobei eine erste Unterteilung nach den verwendeten Rezeptoren erfolgt. Sowohl der kanonische Signalweg, als auch nicht kanonische Signalwege greifen auf Rezeptoren der Fz-Familie zurück, verwenden jedoch unterschiedliche *Downstream*-Komponenten. Kanonische Signalwege nutzen Arm als Mediator der durch TCF regulierten Transkription, während nicht kanonische Signalwege Arm-unabhängig sind und keine Transkriptionsregulation beinhalten (Koles and Budnik, 2012). Weiterhin konnten weitere, atypische Wnt-Rezeptoren identifiziert werden, welche als *Related to Tyrosine Kinase* (Ryk) bezeichnet werden und auch Arm-unabhängige *Downstream*-Komponenten verwenden (Bovolenta et al., 2006; Koles and Budnik, 2012). Inaki und Kollegen konnten zeigen, dass Mutationen sowohl des Fz-2, als auch eines atypischen Drl-2 Rezeptors zu Phänotypen während der Innervation des VL1 führen, welche mit Wnt4-Mutanten vergleichbar sind (Inaki et al., 2007). Die Tatsache, dass der Drl-2 Rezeptor an diesem Prozess beteiligt ist, ist etwas überraschend, das dieser Rezeptor vor allem für seine Interaktion mit dem nicht-kanonischen Wnt5 in Verbindung gebracht wurde (Davis et al., 2008; Harris and Beckendorf, 2007; Reynaud et al., 2015; Yoshikawa et al., 2003). Während der Entwicklung der Retina von *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass Wnt4 atypisch unter Nutzung des Fz-2 Rezeptors und weitgehend unabhängig von Arm und dTCF für die Leitung ventraler Axone entlang der D/V Achse verantwortlich ist (Sato et al., 2006). Weitere Studien beschreiben hingegen eine kanonische Signalweiterleitung nach Stimulation mit Wnt4 (Hamada-Kawaguchi et al., 2014; Harris and Beckendorf, 2007). Die in dieser Arbeit dargelegten Daten legen einen durch kanonische Aktivierung

vermittelten Einfluss während der Bildung der VL1 NMV nahe, welche die Komponenten GSK-3, Arm und dTCF umfasst (**Abbildung 13, 14, 16 und 17**).

Die kanonische Aktivierung von Wnt-Komponenten während der Neurogenese ist vergleichsweise wenig untersucht. Es konnten jedoch einige Beispiele beschrieben werden. In dem Nematoden *C. elegans* wurde eine Rolle von Bar-1/ β -Catenin (dem Wnt-Signal weiterleitenden Homolog von Arm in *C. elegans*) während der axonalen Wegfindung und Synapsenbildung von Motoneuronen gezeigt, welche auch die kanonischen Komponenten Dishevelled (Dsh), GSK-3, Axin und TCF beinhaltet (Maro et al., 2009; Zheng et al., 2015). In *D. melanogaster* wurde eine Rolle von Wg und Arm innerhalb der Pilzkörper während der Langzeitgedächtnisbildung beschrieben (Tan et al., 2013). Außerdem wurde eine Rolle von kanonischer Signalweiterleitung während der Langzeitpotenzierung und Gedächtnisbildung in Vertebraten beobachtet (Chen et al., 2006; Oliva et al., 2013).

Es bleibt offen, wie genau Wnt4 die Bildung und Morphologie der VL1/VL2 NMV reguliert. Wahrscheinlich vermittelt Wnt4 unterschiedliche Einflüsse durch die Nutzung verschiedener Rezeptoren (beispielsweise Fz-2 und Drl-2), was zu einer Aktivierung der kanonischen und nicht-kanonischen Signalweiterleitung führen könnte. Möglicherweise entscheidet der Zellkontext darüber, ob kanonische oder nicht-kanonische Signalwege aktiviert werden. Es ist auch vorstellbar, dass parallel zu Wnt4 weitere Mechanismen wirken und dass sich diese gegenseitig beeinflussen. Auch während der Migration der Speicheldrüse konnte ein paralleles agieren von Wnt4 (kanonisch mit Fz und Fz-2 als Rezeptoren) und Wnt5 (atypisch mit Drl als Rezeptor) beobachtet werden, die distinkte Aspekte der Wegfindung steuerten (Harris and Beckendorf, 2007). Dabei werden frühe Aspekte der Wegfindung durch kanonische Komponenten wie Wnt4, Fz, Fz-2 und dTCF reguliert. Während der späten Phase reagieren die wandernden Speicheldrüsen auf Wnt5 über den Drl-Rezeptor. Die Expression von *drl* ist dabei abhängig von der Aktivität des *Hox*-Gens *Scr* (Harris and Beckendorf, 2007). Weiterhin reagieren Speicheldrüsen während ihrer Wanderung auf Netrine und Slits, beides Faktoren die auch während der axonalen Wegfindung von entscheidender Bedeutung sind (Kolesnikov and Beckendorf, 2005). Künftige Untersuchungen sollten klären, wie genau Wnt4 seine Rezeptoren bindet und ob auch Wnt5 über den Drl-2 Rezeptor an der Bildung der VL1/VL2 NMV beteiligt ist. Im Hippocampus der Vertebraten konnte bereits gezeigt werden, dass kanonische und nicht-kanonische Wnts aktiv sind und pro- beziehungsweise anti-synaptogene Einflüsse ausüben (Davis et al., 2008). Im Vertebratensystem werden

dementsprechend die gleichen Mechanismen benötigt, die auch in den RP-Neuronen während NMV-Entwicklung relevant sind.

4.4 Transkriptionelle Einflüsse während der axonalen Wegfindung und der Synaptogenese

Die axonale Wegfindung ist ein Prozess, welcher an dem sich fortbewegenden Wachstumskegel gesteuert wird und damit teils weit entfernt vom Nukleus reguliert werden muss. Hierbei konnten bedeutende, durch Transkriptionsfaktoren gesteuerte Einflüsse auf diesen Prozess demonstriert werden (Santiago and Bashaw, 2014). So spielt der Homeodomänen-Transkriptionsfaktor *Even-skipped* (*Eve*) eine Rolle während der Spezifizierung der dorsal projizierenden Motoneurone aCC und RP2. *Eve* kontrolliert hierbei die Transkription der Zelladhäsionsproteine *Fas2* und *Neuroglian* (*Nrg*), sowie die des repulsiven *Netrin* Rezeptors *Unc-5* und des *Sidestep* (*Side*) Rezeptors *Beatpath Ia* (*Beatla*) (Zarin et al., 2014). Während dieses Prozesses kollaboriert *Eve* mit den Transkriptionsfaktoren *Zfh-1* und *Grain* (*Grn*), was ein sehr feinjustiertes transkriptionelles Programm innerhalb der Motoneurone aufbaut (Zarin et al., 2012; Zarin et al., 2014). Der Homeodomänen Transkriptionsfaktor *dHb9* reguliert ebenfalls die Expression des *Slit*-Rezeptors *Roundabout* (*Robo*), was für die Wegfindung ventral projizierender RP-Neurone wichtig ist (Santiago et al., 2014).

Die beispielhaft genannten Transkriptionsfaktoren üben einen direkten Einfluss auf die Eigenschaften von Motoneuronen und ihre Verbindungen mit spezifischen Muskeln aus. Dennoch beziehen sich diese Beispiele ausschließlich auf die Rolle der Transkriptionsfaktoren innerhalb von Neuronen und vernachlässigen mögliche Rollen innerhalb der Muskeln. Basierend auf den hier vorgestellten Daten konnte für *Ubx* ein umfassenderes Modell entworfen werden, in welchem *Ubx* die Expression von *Wnt4* und *Dsulf1* in VL2 in den Segmenten A2-A7 reguliert. Weiterhin kontrolliert es *NetrinB* in VL3/4 in diesen Segmenten (**Abbildung 30**). Die Muskeln sekretieren *Wnt4* und *NetrinB*, wobei *Wnt4* möglicherweise durch *Dsulf1* modifiziert wird. Diese Signale werden von den RP-Neuronen wahrgenommen und führen zu einer Aktivierung von *Arm* und *dTCF*, was zur Regulation (Aktivierung oder Repression) von Zielgenen führen könnte, die für die spezifische Synapsenbildung entscheidend sind. *NetrinB* wird von VL3 und VL4 sekretiert und mittels des *Fra*-Rezeptors, welcher von RP3 exprimiert

wird, wahrgenommen (Labrador et al., 2005). Die Beobachtung, dass Ubx diese Signalmoleküle innerhalb der Muskeln reguliert, entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten, welche im Allgemeinen zeigen, dass Ubx die Expression wichtiger Gene verschiedener Signalprozesse reguliert (Agrawal et al., 2011; Slattery et al., 2011b). Für *Wnt4* wurde im visceralen Mesoderm bereits eine Regulation durch *Ubx* gezeigt (Graba et al., 1995).

Wnt4 hat auf RP5 eine repulsive Funktion und führt zu einer Synapse auf VL1, während NetB eine anziehende Wirkung auf den RP3 Wachstumskegel hat (**Abbildung 30**). Die RNAi-Experimente legen nahe, dass diese Prozesse einen zweiten direkten oder indirekten Einfluss von *Ubx* innerhalb der RP-Neurone beinhalten und dass diese im Falle von VL1 von Arm abhängig sind (**Abbildung 17**). In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Baëza und Kollegen konnte mittels der BiFC gezeigt werden, dass Ubx mit dTCF interagiert, während dies für den posterior exprimierten Hox-Transkriptionsfaktor AbdA nicht der Fall war (Baëza et al., 2015). Dieser Unterschied in der Interaktionseigenschaft stellt eine Möglichkeit dar, die beobachteten phänotypischen Unterschiede der VL1 Innervation zwischen *Ubx*- und *abdA*-Mutanten zu erklären. Da für Ubx und Arm bereits eine direkte, sowie genetische Interaktion gezeigt wurde (diese Arbeit und (Bondos et al., 2006; Hsiao et al., 2014)) ist es naheliegend, einen von *Wnt4* induzierten Komplex bestehend aus Ubx, Arm und dTCF anzunehmen. Es könnte aber auch sein, dass Ubx parallel zum *Wnt4*-Signalweg in Motoneuronen aktiv ist (**Abbildung 30**). Zum Beispiel könnte Ubx Faktoren kontrollieren, die für die Wahrnehmung und/oder Prozessierung des *Wnt4*-Signals nötig sind. Für Ubx wurde bereits gezeigt, dass es vornehmlich Zielgene reguliert, die als Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle kategorisiert werden können. Dabei bindet Ubx insbesondere Zielgene für die Regulation der *Wnt*-Signalweiterleitung (Agrawal et al., 2011). So konnte beispielsweise in der Halterenimaginalscheibe eine Bindung des Fz-2 Locus durch Ubx und Hth demonstriert werden, was die Vermutung zulässt, dass Ubx an einer Regulation auf Rezeptorebene teilnehmen könnte (Slattery et al., 2011b). Andererseits wird Fz-2 in den meisten, wenn nicht sogar allen Neuronen exprimiert (Inaki et al., 2007). Möglicherweise wirkt Ubx als Feinjustierung dieser Expression. Weitere Arbeiten in diese Richtung sollten klären, ob ein Komplex aus Ubx, Arm und dTCF *in vitro* und *in vivo* gebildet wird und welche Zielgene von dem Interaktionskomplex reguliert werden.

Innerhalb von RP3 wäre eine durch Ubx vermittelte Regulation des attraktiven Fra-Rezeptors vorstellbar, während in den anderen RP-Neuronen eine Regulation des repulsiven Unc-5 Rezeptors möglich wäre. Beide Gene werden in RP-Neuronen exprimiert, wobei Fra spezifisch in RP3 in späten Stadien exprimiert wird (Labrador et al., 2005). Eine erste Analyse von Ubx in der modENCODE-Datenbank (www.modencode.org) zeigt Ubx-Bindestellen nahe des *fra* und *unc-5* Promotors. In Vertebraten wurde bereits eine von Hox5 Paralogen kontrollierte Repression des *unc-5b* Gens während der Migration und Konnektivität von Neuronen der Brückenkerne (ein Bereich des Hinterhirns) gezeigt (Di Meglio et al., 2013). Dementsprechend sollte die Analyse von *fra* und *unc-5* in Abhängigkeit von Ubx weitere spannende Ergebnisse im Hinblick auf die Differenzierung der RP-Neurone liefern. Weiterhin muss für jedes RP-Neuron geklärt werden, ob und wenn ja wie sie das Wnt4- beziehungsweise NetB-Signal wahrnehmen und wie dies zu einer Neuron-spezifischen Interpretation führt, sodass das Muskelziel korrekt innerviert wird.

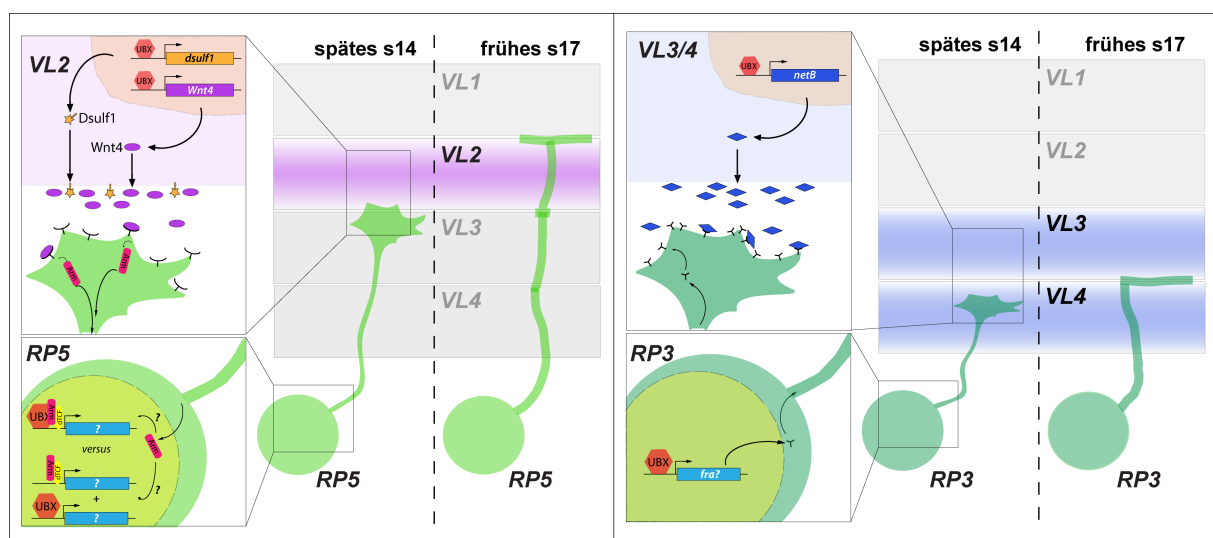


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Ubx Aktivität in VL-Muskeln und RP-Neuronen.

Dieses Schema fasst die genetischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen. Ubx besitzt eine duale Rolle während der Etablierung des spezifischen neuromuskulären Netzwerks, welches aus den ventro-lateralen Muskeln VL1-4 und den sie innervierenden Neuronen (vornehmlich RP3 und RP5) besteht. Dabei kontrolliert Ubx in Muskeln der abdominalen Segmenten A2 bis A7 die Expression der Wegfindungsfaktoren *Wnt4*, *Dsulf1* und *netB* im späten Stadium 14. *Wnt4* führt zu einer Repulsion des RP5 Wachstumskegels, was zu einer neuromuskulären Verbindung auf VL1 führt. *NetB* liefert im Gegensatz dazu ein attraktives Signal für RP3, was Kontakte mit VL3/4 zur Folge hat. Innerhalb der RP-Neurone übernimmt Ubx weitere Rollen bei der Interpretation der Muskelsignale, wobei noch nicht geklärt ist, auf welche Art und Weise diese Regulation erfolgt. Innerhalb der Neurone reguliert Ubx vermutlich Zielgene, deren Identität noch zu klären ist. Innerhalb des RP5 kommt diese Regulation durch eine Interaktion von Ubx mit Arm und dTCF zustande, könnte aber auch parallel ohne Interaktion statt finden

4.5 Hox-vermittelte Apoptose während der Ausbildung neuronaler Netzwerke

Neben ihrer Rolle bei der Differenzierung von Neuronen prägen *Hox*-Gene das neuronale Netzwerk durch die Regulation des programmierten Zelltods (Miguel-Aliaga, 2004; Miguel-Aliaga et al., 2008; Rogulja-Ortmann et al., 2008). So steuert *AbdB* beispielsweise die Apoptose einiger Interneurone des NB3-3 (Birkholz et al., 2013b). *Antp* kontrolliert das Überleben des GW-Neuron, während *Ubx* diesem Prozess entgegen wirkt und damit den Zelltod vermittelt (Rogulja-Ortmann et al., 2008).

Insbesondere bei der Metamorphose spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle. Hier wurde kürzlich gezeigt, dass mit ihrem Beginn alle ventro-lateralen Muskeln und entsprechende RP-Motoneurone degenerieren, außer in A1 und A2, in welchen VL1 und VL2 bis kurz nach dem Schlupf der Imago überleben (Banerjee et al., 2016). Sie helfen dem Tier nach Abschluss der Metamorphose dabei, die Puppenhülle zu verlassen (Banerjee et al., 2016). Diese Muskeln werden, wie bereits beschrieben, von den RP-Neuronen RP1, 4 und 5 innerviert (Broihier et al., 2002; Inaki et al., 2007; Landgraf et al., 1997). Dieses segmentspezifische Überleben legt einen *Hox*-regulierten Prozess nahe. Es könnten in Zukunft Einblicke gewonnen werden, wie der Einfluss von *Ubx* auch auf die gesamte Entwicklungsphase wirkt. Möglicherweise hat *Ubx* während mehrerer Entwicklungsstadien einen Einfluss auf die neuromuskulären Netzwerke der RP-Neurone.

Während die RP-Neurone in ihrer Funktion detailliert beschrieben sind (Banerjee et al., 2016; Broadie et al., 1993; Sink and Whittington, 1991), ist für das GW-Neuron noch offen, um welche Art von Neuron es sich handelt und was die biologische Relevanz seiner Apoptose in T3-A7 ist. Wie die RNAi-Experimente (**Abbildung 28 und 29**) zeigen, handelt es sich hierbei um einen späten Mechanismus (diese Arbeit und (Rogulja-Ortmann et al., 2008)). Basierend auf dem efferenten Axon wurde angenommen, dass es sich um ein Motoneuron handelt (Rogulja-Ortmann et al., 2008; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Schmid und Kollegen postulierten, dass das GW-Neuron die Muskeln VO4-VO6 in T1 und T2 innerviert (Schmid et al., 1999). Es wurde allerdings nicht berücksichtigt, dass A1 und die thorakalen Segmente in dieser Muskelgruppe im Vergleich zu abdominalen Segmenten Abweichungen aufweisen. So ist in T1 keiner der VO-Muskeln und in T2 nur VO2 vorhanden, in T3 nur VO2 und VO3 und in A1 nur VO4 und VO5 (**Abbildung 8** (Bate, 1993)). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die

GW-Projektion in thorakalen Segmenten untersucht und hierbei keine Muskelinnervation festgestellt (**Abbildung 23** und **Abbildung 24**). Die nachfolgenden Markeranalysen während der Embryogenese ließen weder eine Zuordnung als neuropeptiderges Neuron (Dimm negativ, **Abbildung 26**), noch als Motoneuron (pMad und vGlut negativ, **Abbildung 27**) zu. Es stellt sich also weiterhin die Frage, warum das GW-Neuron segmentspezifisch in T1 und T2 überlebt. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich bei dem GW-Neuron um ein spät differenzierendes Motoneuron handelt, welches erst im adulten Tier eine Funktion ausübt. Es konnten bisher einige wenige Beispiele beschrieben werden, in denen bereits embryonal Neurone angelegt werden, die während der larvalen Phase in einem undifferenzierten Zustand verharren, um während der Metamorphose zu differenzieren (Consoulas et al., 2002; Lacin and Truman, 2016). In der kürzlich publizierten Arbeit von Lacin und Truman wurde ein nur für den NB2-3 spezifisches Gal4 Expressionsmuster „immortalisiert“ (Awasaki et al., 2014) und dieser Zellklon in verschiedenen Entwicklungsstadien verfolgt (Lacin and Truman, 2016). Hierbei zeigte sich, dass einige efferente Neurone während der Embryogenese gebildet werden, welche vGlut negativ sind und Axone in die peripheren Nerven entsenden, wo sie jedoch, wie im Fall des GW-Neurons, enden. Im adulten Tier konnten diese Neurone weiter verfolgt werden. In diesem Stadium waren sie vGlut positiv und innervierten die Beinmuskulatur (Lacin and Truman, 2016). Auch konnte ein Einfluss der *Hox*-Gene *Ubx* und *abdA* während der Entstehung dieser entwicklungsabhängig differenzierenden Motoneurone beobachtet werden. So reprimierten die beiden Gene die Bildung dieser NB-Zelllinie in A1-A8 (Lacin and Truman, 2016). Leider existiert nach aktuellem Kenntnisstand keine spezifische NB7-3 Gal4 Linie. Die *eg*-Gal4 Linie würde nach einer „Immortalisierung“ hingegen zu viele Zellklone im Thorax markieren was eine morphologische Unterscheidung der efferenten Nerven und eine Identifikation der GW-Projektion unmöglich machen würde. Die Gemeinsamkeiten des GW-Neurons mit den von Lacin und Truman (2016) beschriebenen entwicklungsabhängig differenzierenden Motoneuronen lassen stark vermuten, dass es sich bei dem GW-Neuron auch um ein Neuron dieses Typus handelt.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Hox-Transkriptionsfaktoren steuern Segmentspezifizierungsvorgänge entlang der A/P-Achse in allen Bilateria auf hoch spezifische Art und Weise. Dabei regulieren sie unter anderem auch die Entwicklung neuromuskulärer Systeme. Eine mögliche Erklärung für die hohe funktionale Spezifität der Hox-Proteine stellt die Interaktion mit zellspezifischen Hilfsfaktoren dar. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Interaktionspartner des Hox-Proteins Ultrabithorax (*Ubx*) in *Drosophila melanogaster* untersucht. Mittels eines neuronalen Modifier-Screens wurden zunächst 18 potentielle Interaktionskandidaten identifiziert. Die Expressionsanalyse von 10 dieser Kandidaten ergab eine überwiegende Expression im sich entwickelnden Nervensystem. Unter Verwendung der Bimolekularen Fluoreszenten Komplementation (BiFC) in Zellkultur konnte eine von der UbdA-Domäne vermittelten Interaktion von *Ubx*-Isoformen mit Debra (*Dbr*), Ataxin 2 binding protein 1 (*A2bp1*) und dem Mediator des Wnt-Signalweges Armadillo/ β -Catenin (*Arm*) gezeigt werden. Um eine mögliche Interaktion *in vivo* zu untersuchen, wurde das neuromuskuläre System des späten Embryos aufgrund seiner Tagma-spezifischen Unterschiede als Modell gewählt. Zu diesem Zweck wurde das thorakale System zunächst auf morphologischer Ebene detailliert beschrieben und dem bereits gut charakterisierten abdominalen System gegenüber gestellt. Darauf aufbauend konnte eine neue Funktion von *Ubx* während der spezifischen Etablierung neuromuskulärer Kontakte zwischen den ventro-lateralen Muskeln (VL1-4) und den RP-Motoneuronen innerhalb der abdominalen Segmente A2-A7 beschrieben werden. In *Ubx* Mutanten sind die entsprechenden Kontakte reduziert oder nicht vorhanden. Auf das thorakale Segment T3 hatte der Verlust von *Ubx* interessanterweise keine Auswirkungen. *Ubx* ist in den VL-Muskeln nötig und ausreichend für die Expression des Signalmoleküls *Wnt4*, welches von VL2 für die Zielfindung spezifischer Motoneurone sekretiert wird. Weiterhin reguliert *Ubx* die Expression von *Dsulf1* und *netB*, welche eine bekannte Rolle während der Zielfindung von RP-Neuronen besitzen. Weiterführende Analysen zeigten, dass *Ubx* interessanterweise auch auf Seiten der entsprechenden Motoneurone die Bildung des neuromuskulären Netzwerks steuert und dies in RP-Neuronen möglicherweise durch Interaktion mit *Arm* reguliert wird.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine neue Funktion von *Ubx* während der Entwicklung des neuromuskulären Systems unter Beteiligung des *Ubx*-Interaktionspartners und Mediator des Wnt-Signalwegs *Arm* beschrieben werden.

5.2 Summary

Hox transcription factors control specification processes along the A/P axis in all bilaterian animals. They do so in a highly specific manner to regulate the development of the motoneuronal system. One possible explanation for the highly functional specificity of Hox proteins are cell specific auxiliary factors. In the presented study new interaction partners of the Hox protein Ultrabithorax from *Drosophila melanogaster* were investigated.

A neuronal Modifier-Screen performed in the lab yielded 18 candidates. Expression analysis of 10 of these candidates showed a predominant expression within the developing central nervous system. Using a cell culture based Bimolecular Fluorescent Complementation Assay (BiFC) an UbdA-Domain dependant interaction of Debra (*Dbr*), Ataxin 2 binding protein 1 (*A2bp1*) and the Wnt signalling mediator Armadillo/ β -Catenin (*Arm*) in combination with *Ubx* isoforms could be demonstrated. To investigate a possible interaction *in vivo* the neuromuscular system was chosen as a model based on its tagma-specific differences. For this purpose, a detailed description of the thoracic segments was created on morphological criteria to complement the detailed descriptions of the abdominal system. Using this information, in a second step *Ubx* dependent defects during the innervation of ventro-lateral muscles VL1-4 were described in abdominal segments A2-A7. In *Ubx* mutants these contacts were reduced or not made. Interestingly, the innervation pattern of thoracic segment T3 was not affected. *Ubx* was necessary and sufficient for the expression of the signalling molecule *Wnt4*, which is secreted by VL2 to mediate neuronal targeting of specific motoneurons. Furthermore, *Ubx* controls the expression of *Dsulf1* and *netB*, which have known roles during pathfinding decisions of RP-neurons. Intriguingly, additional analysis showed that *Ubx* has a role in respective motoneurons during the formation of neuromuscular networks. This is possibly regulated by an interaction with *Arm* in RP-neurons.

Taken together the presented data describe a new function of *Ubx* during the development of RP-motoneurons that involves the *Ubx* interaction partner and mediator of Wnt-signalling *Arm*.

6 Literaturverzeichnis

- Agrawal, P., Habib, F., Yelagandula, R. and Shashidhara, L. S.** (2011). Genome-level identification of targets of Hox protein Ultrabithorax in *Drosophila*: novel mechanisms for target selection. *Sci. Rep.* **1**, 205.
- Ai, X., Do, A., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Emerson, C. P.** (2003). QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. **162**, 341–351.
- Akam, M.** (1998). Hox genes: From master genes to micromanagers. *Curr. Biol.* **8**, R676–R678.
- Allan, D. W., Pierre, S. E. S., Miguel-Aliaga, I. and Thor, S.** (2003). Specification of Neuropeptide Cell Identity by the Integration of Retrograde BMP Signaling and a Combinatorial Transcription Factor Code. *Cell* **113**, 73–86.
- Arendt, D. and Nübler-Jung, K.** (1999). Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* **126**, 2309–2325.
- Awasaki, T., Kao, C.-F., Lee, Y.-J., Yang, C.-P., Huang, Y., Pfeiffer, B. D., Luan, H., Jing, X., Huang, Y.-F., He, Y., et al.** (2014). Making *Drosophila* lineage-restricted drivers via patterned recombination in neuroblasts. *Nat. Neurosci.* **17**, 631–637.
- Baek, M., Enriquez, J. and Mann, R. S.** (2013). Dual role for Hox genes and Hox co-factors in conferring leg motoneuron survival and identity in *Drosophila*. *Development* **140**, 2027–38.
- Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., Rogulja-Ortmann, A., Brun, C. and Merabet, S.** (2015). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife* **4**, 1–28.
- Bajpai, R., Sambrani, N., Stadelmayer, B. and Shashidhara, L. S.** (2004). Identification of a novel target of D/V signaling in *Drosophila* wing disc: Wg-independent function of the organizer. *Gene Expr. Patterns* **5**, 113–121.
- Banerjee, S., Toral, M., Siefert, M., Conway, D., Dorr, M. and Fernandes, J.** (2016). dHb9 expressing larval motor neurons persist through metamorphosis to innervate adult-specific muscle targets and function in *Drosophila* eclosion. *Dev. Neurobiol.*
- Bashaw, G. J. and Klein, R.** (2010). Signaling from axon guidance receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–17.
- Bate, M.** (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791–804.
- Bate, M.** (1993). The mesoderm and its derivatives. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. Bate, M.) and Martinez-Arias, A.), pp. 1013–1090. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bate, M. and Broadie, K.** (1995). Wiring by fly: the neuromuscular system of the *Drosophila* embryo. *Neuron* **15**, 513–25.
- Bello, B. C., Hirth, F. and Gould, A. P.** (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron* **37**, 209–219.
- Bender, W., Akam, M., Karch, F., Beachy, P. A., Peifer, M., Spierer, P., Lewis, E. B. and Hogness, D. S.** (1983). Molecular genetics of the bithorax complex in *D. melanogaster*. *Science (80-)*. **2**, 23–29.
- Berger, C., Pallavi, S. K., Prasad, M., Shashidhara, L. S. and Technau, G. M.** (2005). A critical role for cyclin E in cell fate determination in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Nat. Cell Biol.* **7**, 56–62.
- Bhat, K. M.** (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity

- specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* **21**, 472–85.
- Birkholz, O., Rickert, C., Berger, C., Urbach, R. and Technau, G. M.** (2013a). Neuroblast pattern and identity in the *Drosophila* tail region and role of doublesex in the survival of sex-specific precursors. *Development* **140**, 1830–42.
- Birkholz, O., Vef, O., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C. and Technau, G. M.** (2013b). Abdominal-B and caudal inhibit the formation of specific neuroblasts in the *Drosophila* tail region. *Development* **140**, 3552–64.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3312–3317.
- Bondos, S. E., Tan, X.-X. and Matthews, K. S.** (2006). Physical and genetic interactions link hox function with diverse transcription factors and cell signaling proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 824–34.
- Bornemann, D. J., Duncan, J. E., Staatz, W., Selleck, S. and Warrior, R.** (2004). Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* **131**, 1927–38.
- Bossing, T. and Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* **120**, 1895–1906.
- 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.
- Bovolenta, P., Rodriguez, J. and Esteve, P.** (2006). Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* **133**, 4399–4408.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- Bridoux, L., Deneyer, N., Bergiers, I. and Rezsohazy, R.** (2015). Molecular Analysis of the HOXA2-Dependent Degradation of RCHY1. *PLoS One* **10**, e0141347.
- Broadie, K., Sink, H., Van Vactor, D., Fambrough, D., Whittington, P. M., Bate, M. and Goodman, C. S.** (1993). From growth cone to synapse: the life history of the RP3 motor neuron. *Development* **119**, 227–238.
- Broihier, H. T., Skeath, J. B. and Louis, S.** (2002). *Drosophila* Homeodomain Protein dHb9 Directs Neuronal Fate via Crossrepressive and Cell-Nonautonomous Mechanisms. **35**, 39–50.
- Budnik, V.** (1996). Synapse maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 858–867.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Catela, C., Shin, M. M., Lee, D. H., Liu, J.-P. and Dasen, J. S.** (2016). Hox proteins coordinate motor neuron differentiation and connectivity programs through Ret/Gfra genes. *Submitt. Publ.* **14**, 1901–1915.
- Chan, S.-K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J. and Mann, R. S.** (1994). The DNA binding specificity of ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* **78**, 603–615.
- Charron, F. and Tessier-Lavigne, M.** (2007). The Hedgehog, TGF- β /BMP and Wnt families of morphogens in axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **621**, 116–133.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P. and Tessier-Lavigne, M.** (2003). The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Axonal Chemoattractant that Collaborates with Netrin-1 in Midline Axon Guidance. *Cell* **113**, 11–23.
- Chen, J., Park, C. S. and Tang, S.-J.** (2006). Activity-dependent synaptic Wnt release

- regulates hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 11910–6.
- Consoulas, C., Restifo, L. L. and Levine, R. B.** (2002). Dendritic remodeling and growth of motoneurons during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **22**, 4906–4917.
- Cox, R. T., Pai, L. M., Miller, J. R., Orsulic, S., Stein, J., McCormick, C. a, Audeh, Y., Wang, W., Moon, R. T. and Peifer, M.** (1999). Membrane-tethered *Drosophila* Armadillo cannot transduce Wingless signal on its own. *Development* **126**, 1327–1335.
- Crisp, S., Evers, J. F., Fiala, A. and Bate, M.** (2008). The development of motor coordination in *Drosophila* embryos. *Development* **135**, 3707–17.
- Dai, P., Akimaru, H. and Ishii, S.** (2003). A hedgehog-responsive region in the *Drosophila* wing disc is defined by debra-mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Dev. Cell* **4**, 917–28.
- Dani, N., Nahm, M., Lee, S. and Broadie, K.** (2012). A Targeted Glycan-Related Gene Screen Reveals Heparan Sulfate Proteoglycan Sulfation Regulates WNT and BMP Trans-Synaptic Signaling. *PLoS Genet.* **8**.
- Dasen, J. S., Liu, J.-P. and Jessell, T. M.** (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* **425**, 926–933.
- Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S. and Jessell, T. M.** (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* **123**, 477–491.
- Davis, E. K., Zou, Y. and Ghosh, A.** (2008). Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Dev.* **3**, 32.
- de Navas, L. F., Reed, H., Akam, M., Barrio, R., Alonso, C. R. and Sánchez-Herrero, E.** (2011). Integration of RNA processing and expression level control modulates the function of the *Drosophila* Hox gene Ultrabithorax during adult development. *Development* **138**, 107–16.
- Deshpande, N., Dittrich, R., Technau, G. M. and Urban, J.** (2001). Successive specification of *Drosophila* neuroblasts NB 6-4 and NB 7-3 depends on interaction of the segment polarity genes wingless, gooseberry and naked cuticle. *Development* **128**, 3253–3261.
- Desplan, C., Theis, J. and Farrell, P. H. D.** (1988). The Sequence Interaction Specificity of Homeodomain-DNA. *Cell* **54**, 1081–1090.
- Dhoot, G. K., Gustafsson, M. K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M. and Emerson, C. P.** (2001). Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* **293**, 1663–6.
- Di Meglio, T., Kratochwil, C. F., Vilain, N., Loche, A., Vitobello, A., Yonehara, K., Hrycaj, S. M., Roska, B., Peters, a H., Eichmann, A., et al.** (2013). Ezh2 orchestrates topographic migration and connectivity of mouse precerebellar neurons. *Science (80-.).* **339**, 204–207.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–6.
- 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 Huckebein. *Development* **124**, 2515–25.
- Dixit, R., VijayRaghavan, K. and Bate, M.** (2008). Hox genes and the regulation of movement in *Drosophila*. *Dev. Neurobiol.* **68**, 309–316.

- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855–863.
- Doe, C. Q., Hiromi, Y., Gehring, W. J. and Goodman, C. S.** (1988). Expression and function of the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* neurogenesis. *Science* **239**, 170–175.
- Duboule, D. and Morata, G.** (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* **10**, 358–364.
- Egger, B., Chell, J. M. and Brand, A. H.** (2008). Insights into neural stem cell biology from flies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **363**, 39–56.
- Fellgett, S. W., Maguire, R. J. and Pownall, M. E.** (2015). *Sulf1* has ligand-dependent effects on canonical and non-canonical Wnt signalling. *J. Cell Sci.* **128**, 1408–1421.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Friedrich, J., Sorge, S., Bujupi, F., Eichenlaub, M. P., Schulz, N. G., Wittbrodt, J. and Lohmann, I.** (2016). Hox Function Is Required for the Development and Maintenance of the *Drosophila* Feeding Motor Unit. *Cell Rep.* 1–11.
- Fushiki, A., Zwart, M. F., Kohsaka, H., Fetter, R. D., Cardona, A. and Nose, A.** (2016). A circuit mechanism for the propagation of waves of muscle contraction in *Drosophila*. *Elife* **5**, e13253.
- Garcia-Bellido, A.** (1975). Genetic Control of Wing Disc Development in *Drosophila*. In *Ciba Foundation Symposium 29 - Cell Patterning*, pp. 161–182. John Wiley & Sons, Ltd.
- Gebelein, B., Culi, J., Ryoo, H. D., Zhang, W. and Mann, R. S.** (2002). Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Dev. Cell* **3**, 487–498.
- Geyer, A., Koltsaki, I., Hessinger, C., Renner, S. and Rogulja-Ortmann, A.** (2015). Impact of Ultrabithorax alternative splicing on *Drosophila* embryonic nervous system development. *Mech. Dev.* **138**, 177–189.
- Ghysen, A., Jan, L. Y. and Jant, Y. N.** (1985). Segmental determination in *Drosophila* central nervous system. *Cell* **40**, 943–948.
- Gorczyca, M. G., Phillis, R. W. and Budnik, V.** (1994). The role of *tinman*, a mesodermal cell fate gene, in axon pathfinding during the development of the transverse nerve in *Drosophila*. *Development* **120**, 2143–2152.
- Gould, a P. and White, R. a** (1992). Connectin, a target of homeotic gene control in *Drosophila*. *Development* **116**, 1163–74.
- Graba, Y., Gieseler, K., Aragnol, D., Laurenti, P., Mariol, M., Sagnier, T. and Pradel, J.** (1995). DWnt-4, a novel *Drosophila* Wnt gene acts downstream of homeotic complex genes in the visceral mesoderm. **218**, 209–218.
- Greenspan, R.** (2004). *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hadjieconomou, D., Rotkopf, S., Alexandre, C., Bell, D. M., Dickson, B. J. and Salecker, I.** (2011). Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods* **8**, 260–6.
- Hamada-Kawaguchi, N., Nore, B. F., Kuwada, Y., Smith, C. I. E. and Yamamoto, D.** (2014). Btk29A promotes Wnt4 signaling in the niche to terminate germ cell proliferation in *Drosophila*. *Science* **343**, 294–7.
- Harrelson, a L. and Goodman, C. S.** (1988). Growth cone guidance in insects: fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily. *Science (80-.)*. **242**, 700–708.
- Harris, K. E. and Beckendorf, S. K.** (2007). Different Wnt signals act through the

- Frizzled and RYK receptors during *Drosophila* salivary gland migration. *Development* **134**, 2017–25.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. and Campos -Ortega, J. A.** (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**, 473–485.
- Hatton, A. R., Subramaniam, V. and Lopez, A. J.** (1998). Generation of Alternative Ultrabithorax Isoforms and Stepwise Removal of a Large Intron by Resplicing at Exon–Exon Junctions. *Mol. Cell* **2**, 787–796.
- Hay, B. A., Maile, R. and Rubin, G. M.** (1997). P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5195–200.
- Heckscher, E. S., Long, F., Layden, M. J., Chuang, C.-H., Manning, L., Richart, J., Pearson, J. C., Crews, S. T., Peng, H., Myers, E., et al.** (2014). Atlas-builder software and the eNeuro atlas: resources for developmental biology and neuroscience. *Development* **141**, 2524–32.
- Hewes, R. S., Park, D., Gauthier, S. a, Schaefer, A. M. and Taghert, P. H.** (2003). The bHLH protein Dimmed controls neuroendocrine cell differentiation in *Drosophila*. *Development* **130**, 1771–1781.
- 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.
- Hirth, F., Hartmann, B. and Reichert, H.** (1998). Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* **125**, 1579–1589.
- Hooper, J. E.** (1986). Homeotic gene function in the muscles of *Drosophila* larvae. *EMBO J.* **5**, 2321–2329.
- Hsiao, H.-C., Gonzalez, K. L., Catanese, D. J., Jordy, K. E., Matthews, K. S. and Bondos, S. E.** (2014). The Intrinsically Disordered Regions of the *Drosophila melanogaster* Hox Protein Ultrabithorax Select Interacting Proteins Based on Partner Topology. *PLoS One* **9**, e108217.
- Hudry, B., Viala, S., Graba, Y. and Merabet, S.** (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biol.* **9**, 5.
- Hudry, B., Remacle, S., Delfini, M.-C., Rezsöházy, R., Graba, Y. and Merabet, S.** (2012). Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors. *PLoS Biol.* **10**, e1001351.
- Immergluck, K., Lawrence, P. a. and Bienz, M.** (1990). Induction across germ layers in *Drosophila* mediated by a genetic cascade. *Cell* **62**, 261–268.
- Inaki, M., Yoshikawa, S., Thomas, J. B., Aburatani, H. and Nose, A.** (2007). Wnt4 is a local repulsive cue that determines synaptic target specificity. *Curr. Biol.* **17**, 1574–9.
- Inaki, M., Shinza-Kameda, M., Ismat, A., Frasch, M. and Nose, A.** (2010). *Drosophila* Tey represses transcription of the repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. *Development* **137**, 2139–46.
- 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**, 511–521.
- Jacobs, J. R., Hiromi, Y., Patel, N. H. and Goodman, C. S.** (1989). Lineage, migration, and morphogenesis of longitudinal glia in the *Drosophila* CNS as revealed by a molecular lineage marker. *Neuron* **2**, 1625–1631.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the

- Drosophila larval neuromuscular junction. *J. Physiol.* **262**, 215–236.
- Jaw, T. J., You, L. R., Knoepfler, P. S., Yao, L. C., Pai, C. Y., Tang, C. Y., Chang, L. P., Berthelsen, J., Blasi, F., Kamps, M. P., et al.** (2000). Direct interaction of two homeoproteins, homothorax and extradenticle, is essential for EXD nuclear localization and function. *Mech. Dev.* **91**, 279–91.
- Jones, W. M., Chao, A. T., Zavortink, M., Saint, R. and Bejsovec, A.** (2010). Cytokinesis proteins Tum and Pav have a nuclear role in Wnt regulation. *J. Cell Sci.* **123**, 2179–2189.
- Jung, H. and Dasen, J. S.** (2015). Evolution of Patterning Systems and Circuit Elements for Locomotion. *Dev. Cell* **32**, 408–422.
- 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.
- Kaufman, T. C., Lewis, R. and Wakimoto, B.** (1980). Cytogenetic analysis of chromosome 3 in Drosophila melanogaster: The homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. *Genetics* **94**, 115–133.
- Kerppola, T. K.** (2006). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 449–56.
- Kerppola, T. K.** (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2876–86.
- Kerr, K. S., Fuentes-Medel, Y., Brewer, C., Barria, R., Ashley, J., Abruzzi, K. C., Sheehan, A., Tademir-Yilmaz, O. E., Freeman, M. R. and Budnik, V.** (2014). Glial wingless/Wnt regulates glutamate receptor clustering and synaptic physiology at the Drosophila neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **34**, 2910–20.
- Kiehn, O. and Kullander, K.** (2004). Minireview Central Pattern Generators Deciphered by Molecular Genetics in Figure. *Neuron* **41**, 317–321.
- Kiehn, O., Dougherty, K. J., Hägglund, M., Borgius, L., Talpalar, A. and Restrepo, C. E.** (2010). Probing spinal circuits controlling walking in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 11–18.
- Klassen, M. P. and Shen, K.** (2007). Wnt signaling positions neuromuscular connectivity by inhibiting synapse formation in *C. elegans*. *Cell* **130**, 704–16.
- Kleinschmit, A., Koyama, T., Dejima, K., Hayashi, Y., Kamimura, K. and Nakato, H.** (2010). Drosophila heparan sulfate 6-O endosulfatase regulates Wingless morphogen gradient formation. *Dev. Biol.* **345**, 204–214.
- Klueg, K. M., Alvarado, D., Muskavitch, M. A. T. and Duffy, J. B.** (2002). Creation of a GAL4 / UAS-Coupled Inducible Gene Expression System for Use in Drosophila Cultured Cell Lines. *Genesis* **34**, 119–122.
- Kohsaka, H. and Nose, A.** (2009). Target recognition at the tips of postsynaptic filopodia: accumulation and function of Capricious. *Development* **136**, 1127–1135.
- Koizumi, K., Higashida, H., Yoo, S., Islam, M. S., Ivanov, A. I., Guo, V., Pozzi, P., Yu, S.-H., Rovescalli, A. C., Tang, D., et al.** (2007). RNA interference screen to identify genes required for Drosophila embryonic nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5626–31.
- Koles, K. and Budnik, V.** (2012). Wnt signaling in neuromuscular junction development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**.
- Kolesnikov, T. and Beckendorf, S. K.** (2005). NETRIN and SLIT guide salivary gland migration. *Dev. Biol.* **284**, 102–111.
- Kolodkin, A. L.** (1996). Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci.* **19**, 507–513.

- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). *frazzled* Encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197–204.
- Korkut, C. and Budnik, V.** (2009). WNTs tune up the neuromuscular junction. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 627–34.
- Kornfeld, K., Saint, R. B., Beachy, P. a, Harte, P. J., Peattie, D. a and Hogness, D. S.** (1989). Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in Drosophila. *Genes Dev.* **3**, 243–258.
- Kose, H., Rose, D., Zhu, X. and Chiba, A.** (1997). Homophilic synaptic target recognition mediated by immunoglobulin-like cell adhesion molecule Fasciclin III. *Development* **124**, 4143–4152.
- Labrador, J. P., O’Keefe, D., Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Thomas, J. B. and Bashaw, G. J.** (2005). The homeobox transcription factor even-skipped regulates netrin-receptor expression to control dorsal motor-axon projections in Drosophila. *Curr. Biol.* **15**, 1413–1419.
- Lacin, H. and Truman, J. W.** (2016). Lineage mapping identifies molecular and architectural similarities between the larval and adult Drosophila central nervous system. *Elife* **5**, e13399.
- Lacombe, J., Hanley, O., Jung, H., Philippidou, P., Surmeli, G., Grinstein, J. and Dasen, J. S.** (2013). Genetic and Functional Modularity of Hox Activities in the Specification of Limb-Innervating Motor Neurons. *PLoS Genet.* **9**,
- Lambert, B., Vandeputte, J., Remacle, S., Bergiers, I., Simonis, N., Twizere, J.-C., Vidal, M. and Rezsohazy, R.** (2012). Protein interactions of the transcription factor Hoxa1. *BMC Dev. Biol.* **12**, 29.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G. M. and Bate, M.** (1997). The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of Drosophila. *J. Neurosci.* **17**, 9642–55.
- Lasko, P.** (2000). The Drosophila melanogaster genome: Translation factors and RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* **150**, 51–56.
- Lewis, E. B.** (1963). Genes and Developmental Pathways. *Am. Zool.* **3**, 33–56.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**, 565–570.
- Loureiro, J. and Peifer, M.** (1998). Roles of Armadillo, a Drosophila catenin, during central nervous system development. *Curr. Biol.* **8**, 622–633.
- Lundell, M. J.** (2003). The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of Drosophila. *Development* **130**, 4109–4121.
- Lundell, M. J. and Hirsh, J.** (1998). *eagle* is required for the specification of serotonin neurons and other neuroblast 7-3 progeny in the Drosophila CNS. *Development* **125**, 463–72.
- Lyuksytova, A. I.** (2003). Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling. *Science (80-.).* **302**, 1984–1988.
- Maeda, R. K. and Karch, F.** (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* **133**, 1413–22.
- Mahr, A. and Aberle, H.** (2006). The expression pattern of the Drosophila vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expr. Patterns* **6**, 299–309.
- Mann, R. S. and Chan, S. K.** (1996). Extra specificity from extradenticle: The partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* **12**, 258–262.
- Maro, G. S., Klassen, M. P. and Shen, K.** (2009). A beta-catenin-dependent Wnt

- pathway mediates anteroposterior axon guidance in *C. elegans* motor neurons. *PLoS One* **4**, e4690.
- Marqués, G.** (2005). Morphogens and synaptogenesis in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **64**, 417–34.
- Martinez-Arias, A. and Lawrence, P. A.** (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* **313**, 639–642.
- Matthes, D. J., Sink, H., Kolodkin, a L. and Goodman, C. S.** (1995). Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell* **81**, 631–639.
- Mauss, A., Tripodi, M., Evers, J. F. and Landgraf, M.** (2009). Midline signalling systems direct the formation of a neural map by dendritic targeting in the *Drosophila* motor system. *PLoS Biol.* **7**,.
- McCabe, B. D., Marqués, G., Haghghi, A. P., Fetter, R. D., Crotty, M. L., Haerry, T. E., Goodman, C. S. and O'Connor, M. B.** (2003). The BMP Homolog Gbb Provides a Retrograde Signal that Regulates Synaptic Growth at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Neuron* **39**, 241–254.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R.** (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283–302.
- McQuilton, P., St Pierre, S. E., Thurmond, J., Gelbart, W., Brown, N., Kaufman, T., Matthews, K., Werner-Washburne, M., Cripps, R., Crosby, L., et al.** (2012). FlyBase 101 - The basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* **40**, 706–714.
- Merabet, S. and Lohmann, I.** (2015). Toward a New Twist in Hox and TALE DNA-Binding Specificity. *Dev. Cell* **32**, 259–261.
- Merabet, S., Saadaoui, M., Sambrani, N., Hudry, B., Pradel, J., Affolter, M. and Graba, Y.** (2007). A unique Extradenticle recruitment mode in the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16946–51.
- Michelson, A. M.** (1994). Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. **768**, 755–768.
- Miguel-Aliaga, I.** (2004). Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development* **131**, 6093–6105.
- Miguel-Aliaga, I., Thor, S. and Gould, A. P.** (2008). Postmitotic specification of *Drosophila* insulinergic neurons from pioneer neurons. *PLoS Biol.* **6**, 0538–0551.
- Mitchell, K. J., Doyle L., J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J.** (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17**, 203–215.
- Müller, M., Affolter, M., Leupin, W., Otting, G., Wüthrich, K. and Gehring, W. J.** (1988). Isolation and sequence-specific DNA binding of the Antennapedia homeodomain. *EMBO J.* **7**, 4299–4304.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273.
- Ni, J.-Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.-P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.-S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., et al.** (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat Meth* **8**, 405–407.
- Nose, A.** (2012). Generation of neuromuscular specificity in *Drosophila*: novel mechanisms revealed by new technologies. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 1–11.
- Nose, A., Mahajan, V. B. and Goodman, C. S.** (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* **70**, 553–567.

- 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**, 1027–1036.
- Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795–801.
- Oliva, C. A., Vargas, J. Y. and Inestrosa, N. C.** (2013). Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 224.
- Packard, M., Koo, E. S., Gorczyca, M., Sharpe, J., Cumberledge, S. and Budnik, V.** (2002). The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell* **111**, 319–30.
- Pai, L. M., Orsulic, S., Bejsovec, a and Peifer, M.** (1997). Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in *Drosophila*. *Development* **124**, 2255–66.
- Park, D., Veenstra, J. A., Park, J. H. and Taghert, P. H.** (2008). Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: Where DIMM fits in. *PLoS One* **3**,.
- Parker, L., Ellis, J. E., Nguyen, M. Q. and Arora, K.** (2006). The divergent TGF-beta ligand Dawdle utilizes an activin pathway to influence axon guidance in *Drosophila*. *Development* **133**, 4981–91.
- Pearson, J. C., Lemons, D. and McGinnis, W.** (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 893–904.
- Peifer, M. and Wieschaus, E.** (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell* **63**, 1167–1176.
- Pereanu, W., Spindler, S., Im, E., Buu, N. and Hartenstein, V.** (2007). The emergence of patterned movement during late embryogenesis of *Drosophila*. *Dev. Neurobiol.* **67**, 1669–1685.
- Perrimon, N.** (1994). The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. *Cell* **76**, 781–784.
- Philippidou, P. and Dasen, J. S.** (2013). Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization. *Neuron* **80**, 12–34.
- Philippidou, P., Walsh, C. M., Aubin, J., Jeannotte, L. and Dasen, J. S.** (2012). Sustained Hox5 gene activity is required for respiratory motor neuron development. *Nat. Neurosci.* **15**,.
- Picao-Osorio, J., Johnston, J., Landgraf, M., Berni, J. and Alonso, C. R.** (2015). Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Science* **11**, 329–338.
- Pradel, J. and White, R. a H.** (1998). From selectors to realizators. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 417–421.
- Prokop, a** (1999). Integrating bits and pieces: synapse structure and formation in *Drosophila* embryos. *Cell Tissue Res.* **297**, 169–86.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* **111**, 79–88.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1994). Early tagma-specific commitment of *Drosophila* CNS progenitor NB1-1. *Development* **120**, 2567–2578.
- Reed, H. C., Hoare, T., Thomsen, S., Weaver, T. A., White, R. a H., Akam, M. and Alonso, C. R.** (2010). Alternative splicing modulates Ubx protein function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **184**, 745–58.
- Reynaud, E., Lahaye, L. L., Boulanger, A., Petrova, I. M., Marquilly, C., Flandre, A., Martiane, T., Privat, M., Noordermeer, J. N., Fradkin, L. G., et al.** (2015). Guidance of *Drosophila* Mushroom Body Axons Depends upon DRL-Wnt Receptor Cleavage in the Brain Dorsomedial Lineage Precursors. *Cell Rep.* **11**, 1293–1304.
- Riechmann, V. and Ephrussi, A.** (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis.

- Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 374–83.
- Rogulja-Ortmann, A., Lüer, K., Seibert, J., Rickert, C. and Technau, G. M.** (2007). Programmed cell death in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**, 105–116.
- Rogulja-Ortmann, A., Renner, S. and Technau, G. M.** (2008). Antagonistic roles for Ultrabithorax and Antennapedia in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* **135**, 3435–3445.
- Rogulja-Ortmann, A., Picao-Osorio, J., Villava, C., Patraquim, P., Lafuente, E., Aspden, J., Thomsen, S., Technau, G. M. and Alonso, C. R.** (2014). The RNA-binding protein ELAV regulates Hox RNA processing, expression and function within the *Drosophila* nervous system. *Development* **141**, 2046–2056.
- Rørth, P.** (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12418–22.
- Rørth, P., Szabo, K., Bailey, a, Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milán, M., Benes, V., Ansorge, W., et al.** (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049–57.
- Ruiz-Cañada, C. and Budnik, V.** (2006). Introduction on The Use of The *Drosophila* Embryonic/Larval Neuromuscular Junction as A Model System to Study Synapse Development and Function, and A Brief Summary of Pathfinding and Target Recognition. *Int. Rev. Neurobiol.* **75**, 1–31.
- Sánchez-Herrero, E.** (2013). Hox Targets and Cellular Functions. *Scientifica (Cairo)*. **2013**, 738257.
- Santiago, C. and Bashaw, G. J.** (2014). Transcription factors and effectors that regulate neuronal morphology. *Development* **141**, 4667–4680.
- Santiago, C., Labrador, J. and Bashaw, G. J.** (2014). The Homeodomain Transcription Factor Hb9 Controls Axon Guidance in *Drosophila* through the Regulation of Robo Receptors. *Cell Rep.* **7**, 153–165.
- Sato, M., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T. and Tabata, T.** (2006). DWnt4 regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the *Drosophila melanogaster* visual system. *Nat. Neurosci.* **9**, 67–75.
- 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**, 4653–4689.
- 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.
- Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **27**, 353–365.
- Schnorrer, F. and Dickson, B. J.** (2004). Axon Guidance: Morphogens Show the Way. *Curr. Biol.* **14**, R19–R21.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996). Genetic Dissection of Structural and Functional Components of Synaptic Plasticity. I. Fasciclin II Controls Synaptic Stabilization and Growth. *Neuron* **17**, 641–654.
- Serpe, M. and O'Connor, M. B.** (2006). The metalloprotease tolloid-related and its TGF-beta-like substrate Dawdle regulate *Drosophila* motoneuron axon guidance. *Development* **133**, 4969–4979.
- Sink, H. and Whittington, P. M.** (1991). Pathfinding in the central nervous system and periphery by identified embryonic *Drosophila* motor axons. *Development* **112**, 307–

316.

- 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**, 939–946.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B.** (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J.* **8**, 714–721.
- Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., Zhou, T., Rohs, R., Honig, B., Bussemaker, H. J., et al.** (2011a). Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between hox proteins. *Cell* **147**, 1270–1282.
- Slattery, M., Ma, L., Négre, N., White, K. P. and Mann, R. S.** (2011b). Genome-wide tissue-specific occupancy of the Hox protein Ultrabithorax and Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS One* **6**, e14686.
- Speese, S. D. and Budnik, V.** (2007). Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci.* **30**, 268–75.
- Sperry, R. W.** (1963). Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **50**, 703–710.
- St Johnston, D.** (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 176–88.
- Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K., et al.** (2002). The *Drosophila* Gene Collection: Identification of Putative Full-Length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* Genes. *Genome Res.* **12**, 1294–1300.
- Stoeckli, E. T. and Landmesser, L. T.** (1998). Axon guidance at choice points. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 73–79.
- Strochlic, L., Falk, J., Goillot, E., Sigoillot, S., Bourgeois, F., Delers, P., Rouvière, J., Swain, A., Castellani, V., Schaeffer, L., et al.** (2012). Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One* **7**, e29976.
- Subramaniam, V., Bomze, H. M. and Lopez, A. J.** (1994). Functional differences between Ultrabithorax protein isoforms in *Drosophila melanogaster*: Evidence from elimination, substitution and ectopic expression of specific isoforms. *Genetics* **136**, 979–991.
- Tan, Y., Yu, D., Busto, G. U., Wilson, C. and Davis, R. L.** (2013). Wnt Signaling Is Required for Long-Term Memory Formation. *Cell Rep.* **4**, 1082–1089.
- Technau, G. M., Berger, C. and Urbach, R.** (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev. Dyn.* **235**, 861–869.
- Technau, G. M., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C., Birkholz, O. and Rickert, C.** (2014). Composition of a Neuromere and Its Segmental Diversification under the Control of Hox Genes in the Embryonic CNS of *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **28**, 171–180.
- Tran, K. D. and Doe, C. Q.** (2008). Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development* **135**, 3491–9.
- Tran, T. H., Shi, X., Zaia, J. and Ai, X.** (2012). Heparan sulfate 6-O-endosulfatases (Sulfs) coordinate the Wnt signaling pathways to regulate myoblast fusion during skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **287**, 32651–32664.
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R. and Peleg, Y.** (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J. Struct. Biol.* **172**, 34–44.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2003a). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621–3637.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2003b). Segment polarity and DV patterning gene

- expression reveals segmental organization of the *Drosophila* brain. *Development* **130**, 3607–3620.
- Urbach, R., Jussen, D. and Technau, G. M.** (2016). Gene expression profiles uncover individual identities of gnathal neuroblasts and serial homologies in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development* **143**, 1290–1301.
- Valenta, T., Hausmann, G. and Basler, K.** (2012). The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–36.
- van den Ent, F. and Löwe, J.** (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **67**, 67–74.
- Venken, K. J. T. and Bellen, H. J.** (2014). Chemical mutagens, transposons, and transgenes to interrogate gene function in *Drosophila melanogaster*. *Methods* **68**, 15–28.
- Weiszmann, R., Hammonds, A. S. and Celniker, S. E.** (2009). Determination of gene expression patterns using high-throughput RNA in situ hybridization to whole-mount *Drosophila* embryos. *Nat. Protoc.* **4**, 605–618.
- Wheeler, W. M.** (1891). Neuroblasts in the arthropod embryo. *J. Morphol.* **4**, 337–343.
- White, R. A. H. and Wilcox, M.** (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *EMBO J.* **4**, 2035–2043.
- Winberg, M. L., Mitchell, K. J. and Goodman, C. S.** (1998a). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: Complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* **93**, 581–591.
- Winberg, M. L., Noordermeer, J. N., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Spriggs, M. K., Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1998b). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **95**, 903–16.
- Wojcinski, A., Nakato, H., Soula, C. and Glise, B.** (2011). DSulfatase-1 fine-tunes Hedgehog patterning activity through a novel regulatory feedback loop. *Dev. Biol.* **358**, 168–180.
- Wolpert, L.** (1989). Positional information revisited. *Development* **107 Suppl**, 3–12.
- Yanagawa, S., Lee, J., Ishimoto, A. and Chem, J. B.** (1998). Identification and Characterization of a Novel Line of *Drosophila* Schneider S2 Cells That Respond to Wingless Signaling. *Journal Biol. Chem.* **273**, 32353–32359.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M. and Thomas, J. B.** (2003). Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* **422**, 583–8.
- Yu, X. and Malenka, R. C.** (2003). Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat. Neurosci.* **6**, 1169–77.
- Zarin, a. a., Daly, a. C., Hulsmeier, J., Asadzadeh, J. and Labrador, J.-P.** (2012). A GATA/homeodomain transcriptional code regulates axon guidance through the Unc-5 receptor. *Development* **139**, 1798–1805.
- Zarin, A. A., Asadzadeh, J., Hokamp, K., McCartney, D., Yang, L., Bashaw, G. J. and Labrador, J. P.** (2014). A transcription factor network coordinates attraction, repulsion, and adhesion combinatorially to control motor axon pathway selection. *Neuron* **81**, 1297–1311.
- Zheng, C., Diaz-Cuadros, M. and Chalfie, M.** (2015). Dishevelled attenuates the repelling activity of Wnt signaling during neurite outgrowth in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 201518686.
- Zhong, W. and Chia, W.** (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 4–11.
- Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H. and Nambu, J. R.** (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**, 5131–5136.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

7.1.1 Allgemeine Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A/P	Anterior/Posterior
A2-A7	Abdominale Segmente 2-7
aCC	<i>anterior corner cell</i>
ad	Latein: bis
Amp.	Ampicillin
<i>Ant-C</i>	Antennapedia Komplex
Aqua dest.	entmineralisiertes Wasser
AS-C	<i>Achaete-Scute Complex</i>
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescent Complementation</i>
bp	Basenpaare
BX-C	<i>Bithorax Complex</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C1-C3	Gnathale Segmente 1-3
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD4::tdGFP	Fusionsprotein aus dem Oberflächenprotein Cluster of Differentiation 8 und tandemGFP
CD8::GFP	Fusionsprotein aus dem Oberflächenprotein Cluster of Differentiation 8 und GFP
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Proteinkodierende Sequenz
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
D/V	Dorso/ventral
DA	<i>Dorsal Acute</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	<i>Dorso Medial</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DO	Dorsal Oblique
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
DT	Dorsal Transvers
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Even skipped-positiv, lateral
et al.	et alteres (Latein: und andere)
FBS	fötales bovines Serum
FD	Fast Digest (Restriktionsendonukleasen mit besonders geringen Inkubationszeiten)
for	<i>forward</i>
FRT	<i>Flipase recombination target</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün-fluoreszierendes-Protein „ <i>green fluorescent protein</i> “
GMZ	Ganglienmutterzelle
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
HF	<i>High Fidelity</i>
Hs	Hemisegment
Hz	Hertz
<i>in frame</i>	unter Beachtung des Offenen Leserahmens
<i>in situ</i>	im Gewebe
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
ISN	Intersegmentaler Nerv
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KPO ₄	Kaliumphosphat
l	Liter
L1	Larvalstadium 1

L3	Larvalstadium 3
LB-Medium	„Lysogeny Broth“ Medium
LBD	<i>lateral bipolar dendrite cell</i>
LL	<i>Lateral Longitudinal</i>
LO	<i>Lateral Oblique</i>
LT	<i>Lateral Transverse</i>
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Terzolum-Chlorid
NE	Neuroektoderm
ng	Nanogramm
NMV	Neuromuskuläre Verbindung
O ₂	Molekularer Sauerstoff
Ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PBT	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“) + 0,3 % Triton X-100
PBTween	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“) + 0,05 % Tween20
pCC	<i>posterior corner cell</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii
pNR	procephale neurogene Region
POD	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
PS	Parasegment
PZT	Programmierter Zelltod

rev	<i>reverse</i>
RF	<i>Restriction Free</i> – ohne Nutzung von Restriktionsendonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S1-5	Segregationswelle 1-5
SAP	<i>Shrimp-Alkaline-Phosphatase</i>
SBM	<i>Segment Border Muscle</i> (Segmentgrenzenmuskel)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
sec	Sekunden
Seq	Sequenzierung
SN	Segmentaler Nerv
St	Embryonalstadium
T1-T3	Thorakale Segmente 1-3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TN	Transversaler Nerv
U	<i>units</i> (= Maß für die Aktivität)
ü.N.	über Nacht; 16h
ü.T.	Über Tag; 8h
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v	Volumen
VA	<i>Ventral Acute</i>
VI	<i>Ventral Internal</i>
VIS	<i>Ventral Intersegmental</i>
VL	<i>Ventro Lateral</i>
vNR	Ventrale neurogene Region
vNS	Ventrales Nervensystem
VO	<i>Ventro Oblique</i>
Vol.	Volumen
VT	<i>Ventral Transverse</i>
w	Gewicht (<i>weight</i>)

Wnt	Zusammengesetzt aus Wingless (Wg) aus <i>Drosophila melanogaster</i> und Int-1 aus <i>Mus musculus</i> , Liganden des Signalweges
WT	Wildtyp
ZAM	Zelladhäsionsmolekül
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	alpha
β	beta
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

7.1.2 Abkürzungen für Gene

<i>abdA</i>	<i>abdominal A</i>
<i>AbdB</i>	<i>Abdominal B</i>
<i>Antp</i>	<i>Antennapedia</i>
<i>Apc</i>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>
<i>beta Gal</i>	<i>beta Galaktosidase</i>
<i>ct</i>	<i>cut</i>
<i>Dfd</i>	<i>Deformed</i>
<i>drl</i>	<i>derailed</i>
<i>dsh</i>	<i>dishevelled</i>
<i>Dsulf1</i>	<i>Drosophila sulfated 1</i>
<i>eg</i>	<i>eagle</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>eve</i>	<i>even-skipped</i>
<i>fra</i>	<i>frazzled</i>
<i>fz</i>	<i>frizzled</i>
<i>GSK</i>	<i>glycogen synthetase kinase3 (shaggy)</i>
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
<i>ind</i>	<i>intermediate neuroblast defective</i>
<i>msh</i>	<i>Muscle segment homeobox</i>
<i>pan</i>	<i>pangolin (dTCF)</i>
<i>sca</i>	<i>scabrous</i>
<i>Scr</i>	<i>Sex combs reduced</i>

<i>TCF</i>	<i>T-cell factor (pan)</i>
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>unc-5</i>	<i>uncoordinated-5</i>
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defective</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>

In der gesamten Arbeit wurden Genbezeichnungen, Allele und deren RNA kursiv gehalten. Wenn es sich um ein dominant beschriebenes Allel handelte, wurde ein großer Anfangsbuchstabe verwendet, bei einem rezessiv beschriebenen Allel hingegen ein kleiner Anfangsbuchstabe (McQuilton et al., 2012). Bei Proteinen wurde der Anfangsbuchstabe grundsätzlich groß geschrieben und keine kursive Schreibweise verwendet.

7.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ENTSTEHUNG DES EMBRYONALEN NERVENSYSTEMS IN <i>D. MELANOGASTER</i>	3
ABBILDUNG 2: EXPRESSION DER <i>Hox</i> -GENE UND EFFEKTE AUF DIE ENTWICKLUNG VON NB-ZELLINIEN.	8
ABBILDUNG 3: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER REGULATION VON AXONALER WEGFINDUNG UND MUSKELZIELFINDUNG AM BEISPIEL DES RP3-NEURONS.	11
ABBILDUNG 4: FLYBOW-PROTOKOLL ZUR GEWINNUNG SPÄTER EMBRYONEN. DAS GEZEIGTE PROTOKOLL WURDE VERWENDET, UM SPÄTE EMBRYONEN FÜR DIE ANALYSE DES THORAKALEN PROJEKTIONSMUSTERS DES GW-NEURONS ZU GEWINNEN. ES WURDEN SOWOHL EMBRYONEN, ALS AUCH LARVEN MIT DIESEM PROTOKOLL UNTERSUCHT.	43
ABBILDUNG 5: IDENTIFIKATION NEUER PROTEIN-INTERAKTIONSPARTNER DES HOX-PROTEINS UBX.	56
ABBILDUNG 6: EXPRESSIONSANALYSE AUSGEWÄHLTER KANDIDATEN.	59
ABBILDUNG 7: ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN AUSGEWÄHLTER KANDIDATEN MIT DEN VERSCHIEDENEN UBX-ISOFORMEN.....	63
ABBILDUNG 8: MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES NEUROMUSKULÄREN SYSTEMS IM SPÄTEN EMBRYO.....	68
ABBILDUNG 9: UBX-EXPRESSIONSANALYSE IN VENTRO-LATERALEN MUSKELN UND RP NEURONEN.....	69
ABBILDUNG 10: <i>UBX</i> TRÄGT ZUR AUSBILDUNG DES INNERVATIONSMUSTERS DER VENTRO-LATERALEN MUSKELGRUPPE IN A2 BIS A7 BEI.....	72
ABBILDUNG 11: DER VERLUST DER <i>UBX</i> -FUNKTION FÜHRT ZU KEINEN MORPHOLOGISCHEN UNTERSCHIEDEN IN T3 UND A1.	74
ABBILDUNG 12: RP5 IST IN <i>UBX</i> -MUTANTEN VORHANDEN.....	75
ABBILDUNG 13: <i>UBX</i> INTERAGIERT AUF GENETISCHER EBENE MIT DEM <i>WNT4</i> -SIGNALWEG WÄHREND DER AUSBILDUNG DES VL1 KONTAKTS IN A2 BIS A7.....	79
ABBILDUNG 14: <i>WNT4^{EMS23}</i> UND <i>ARM⁸</i> ZEIGEN VERGLEICHBARE DEFEKTE WÄHREND DER VL1 INNERVATION.....	80
ABBILDUNG 15: <i>UBX</i> INTERAGIERT AUF GENETISCHER EBENE MIT <i>FRA</i> WÄHREND DER AUSBILDUNG DES VL3/4 KONTAKTS DURCH RP3 IN A2 BIS A7.....	82
ABBILDUNG 16: DER KANONISCHE <i>WNT4</i> -SIGNALWEG IST IN RP-NEURONEN IN A2 BIS A7 AKTIV.....	85
ABBILDUNG 17: <i>ARM</i> , <i>FRA</i> UND <i>UBX</i> SIND ZELLAUTONOM IN RP-NEURONEN NÖTIG, UM EINE KORREKTE ZIELFINDUNG ZU GEWÄHRLEISTEN.....	87
ABBILDUNG 18: <i>UBX</i> KONTROLLIERT DIE EXPRESSION VON <i>Wnt4</i> , <i>Dsulf1</i> UND <i>NETB</i> , FAKTOREN DER AXONALEN WEGFINDUNG, IN VENTRO-LATERALEN MUSKELN.	90
ABBILDUNG 19: <i>UBX</i> IST AUSREICHEND FÜR DIE EXPRESSION VON <i>Wnt4</i> UND <i>Dsulf1</i> IN VENTRO-LATERALEN MUSKELN. 91	
ABBILDUNG 20: <i>UBX</i> IST VON A2 BIS A7 SOWOHL IN VL1 ALS AUCH IN RP5 NÖTIG, UM EINE KORREKTE INNERVATION ZU GEWÄHRLEISTEN.....	93

ABBILDUNG 21: MUSKELSPEZIFISCHE EXPRESSION VON <i>Ubx</i> KANN DIE EXPRESSION VON <i>Wnt4</i> IN <i>Ubx¹</i> MUTANTEN RETTEN.....	94
ABBILDUNG 22: EXPRESSIONSANALYSE VON <i>Ubx</i> IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN RETTUNGSSITUATIONEN.....	95
ABBILDUNG 23: VISUALISIERUNG DES GW-PROJEKTIONSMUSTERS MITTELS FLYBOW.....	98
ABBILDUNG 24: VISUALISIERUNG DER GW-PROJEKTION MITTELS FLYBOW UND NEUROMUSKULÄREN MARKERN ZEIGT KEIN INNERVATIONSZIEL WÄHREND DER EMBRYOGENESE.....	99
ABBILDUNG 25: DIE VERFOLGUNG DER GW-PROJEKTION IN LARVALE ENTWICKLUNGSSTADIEN UNTER NUTZUNG VON FLYBOW ZEIGT KEINE INNERVATION VON MUSKELN.....	100
ABBILDUNG 26: DAS GW-NEURON IST NEGATIV FÜR DEN NEUROSEKRETORISCHEN MARKER DIMM.....	101
ABBILDUNG 27: DAS GW-NEURON IST NEGATIV FÜR MARKER VON MOTONEURONEN.....	103
ABBILDUNG 28: DEPLETION VON <i>Ubx</i> IM GW-NEURON VERHINDERT DESSEN PROGRAMMIERTEN ZELLTOD.....	104
ABBILDUNG 29: DIE REDUKTION VON <i>Ubx</i> IM GW-NEURON FÜHRT ZU EINER ERHALTUNG DES AXONS, JEDOCH ZU KEINER ERHÖHUNG DER PMAD-LEVEL.....	106
ABBILDUNG 30: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER <i>Ubx</i> AKTIVITÄT IN VL-MUSKELN UND RP-NEURONEN.....	116

7.3 Tabellenverzeichnis

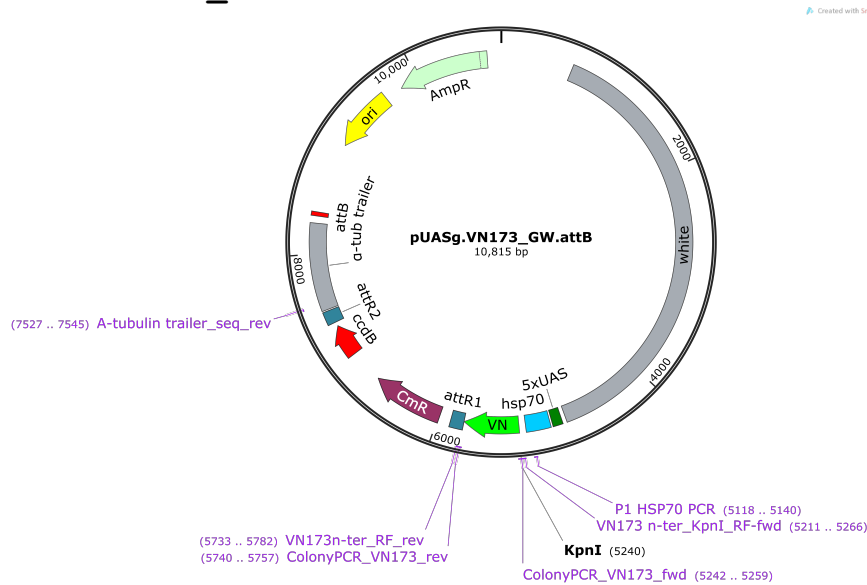
TABELLE 1: GERÄTE.....	13
TABELLE 2: OLIGONUKLEOTIDE.....	14
TABELLE 3: VERWENDETE ENZYME.....	16
TABELLE 4: VERWENDETE KITS UND GRÖßENSTANDARDS.....	16
TABELLE 5: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	17
TABELLE 6: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER.....	18
TABELLE 7: VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME.....	19
TABELLE 8: VERWENDETE BAKTERIENLINIEN MIT SPEZIFISCHER ANWENDUNG.....	20
TABELLE 9: VERWENDETE FLIEGENSTÄMME.....	20
TABELLE 10: PIPETTIERSCHEMA STANDARD PCR.....	25
TABELLE 11: THERMOCYCLERPROGRAMM STANDARD PCR.....	26
TABELLE 12: PIPETTIERSCHEMA KOLONIE PCR.....	26
TABELLE 13: THERMOCYCLERPROGRAMM KOLONIE PCR.....	27
TABELLE 14: PIPETTIERSCHEMA RESTRIKTIONSVERDAU.....	28
TABELLE 15: PIPETTIERSCHEMA LIGATION.....	29
TABELLE 16: THERMOCYCLERPROGRAMM LIGATION.....	29
TABELLE 17: PIPETTIERSCHEMA DER ERSTEN RF-PCR.....	32
TABELLE 18: PIPETTIERSCHEMA DER ZWEITEN RF-PCR.....	32
TABELLE 19: THERMOCYCLERPROGRAMM DES RF-KLONIERENS.....	33
TABELLE 20: PIPETTIERSCHEMA DER <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION.....	35
TABELLE 21: : PIPETTIERSCHEMA DER TRANSFEKTION VON S2R+ ZELLEN.....	37
TABELLE 22: VERWENDETE SONDEN.....	49
TABELLE 23: DER <i>MODIFIER</i> -SCREEN IN FLIEGENAUGEN LIEFERT 18 KANDIDATEN.....	57

7.4 Plasmidkarten und Sequenzen

7.4.1 Generierte BiFC-Destination-Vektoren

Der pUASg.attB stellt ein generöses Geschenk von Dr. Johannes Bischof (Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Universität Zürich, Schweiz) dar. Die VN und VC cDNAs wurden freundlicherweise von Dr. Samir Merabet (Institut für funktionelle Genomic Lyon (IGFL), Frankreich) zur Verfügung gestellt.

>pUASg.VN173_GW.attB (10,815 bp)



ATGTA	white
CGGAG	5x UAS
CGCCG	hsp70 Promotor
ATGGT	VN173
ACAAG	attR
ATGGA	CmR (Chloramphenicol Resistenz)
ATGCA	ccdB Gen
ACTAA	alpha tubulin trailer

```

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCAT
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATA
GGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAA
GTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGC
GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC
TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG
CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAAT
TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGTACCGGGCCCCCTAGTATGTATGTAAGT
TAATAAAACCCATTTTTTGC GGAAAGTAGATAAAAAAACATTTTTTTTTTTTTACTGCACTGG
ATATCATTGAACTTATCTGATCAGTTTTAAATTTACTTCGATCCAAGGGTATTTGATGTACC
    
```

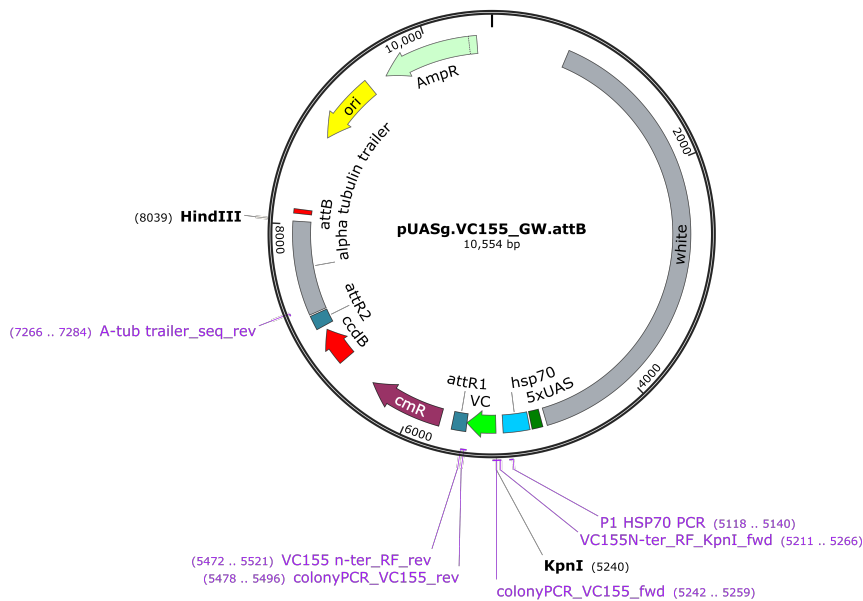
AGGTTCTTTCGATTACCTCTCACTCAAATGACATTCCACTCAAAGTCAGCGCTGTTTGCCT
CCTTCTCTGTCCACAGAAATATCGCCGTCTCTTTCGCCGTGCGTCCGCTATCTCTTTCGCC
ACCGTTTGTAGCGTTACGTAGCGTCAATGTCCGCCCTCAGTTGCATTTTGTGTCAGCGGTTTCG
TGACGAAGCTCCAAGCGGTTTACGCCATCAATTAACACAAAGTGCTGTGCCAAAACCTCCTC
TCGCTTCTTATTTTTGTTTGTTTTTGAGTGATTGGGGTGGTGATTGGTTTTGGGTGGGTAA
GCAGGGGAAAGTGTGAAAAATCCCGCAATGGGCCAAGAGGATCAGGAGCTATTAATTCGCG
GAGGCAGCAAACACCCATCTGCCGAGCATCTGAACAATGTGAGTAGTACATGTGCATACATC
TTAAGTTCACCTGATCTATAGGAACTGCGATTGCAACATCAAATTGTCTGCGGCGTGAGAAC
TGCGACCCACAAAATCCCAAACCGCAATTGCACAAACAAATAGTGACACGAAACAGATTAT
TCTGGTAGCTGTTCTCGCTATATAAGACAATTTTTGAGATCATATCATGATCAAGACATCTA
AAGGCATTCATTTTCGACTATATTCTTTTTTACAAAAATATAACAACCAGATATTTTAAGC
TGATCCTAGATGCACAAAAATAAATAAAAGTATAAACCTACTTCGTAGGATACTTCGGGGT
ACTTTTTGTTTCGGGGT TAGATGAGCATAACGCTTGTAGTTGATATTTGAGATCCCCTATCAT
TGCAGGGTGACAGCGGAGCGGCTTCGCAGAGCTGCATTAACCAGGGCTTCGGGCAGGCCAAA
AACTACGGCACGCTCCGGCCACCCAGTCCGGCCGGAGGACTCCGGTTCAGGGAGCGGCCAACT
AGCCGAGAACCTCACCTATGCCTGGCACAATATGGACATCTTTGGGGCGGTCAATCAGCCGG
GCTCCGGATGGCGGCAGCTGGTCAACCGGACACGCGGACTATTCTGCAACGAGCGACACATA
CCGGCGCCAGGAAACATTTGCTCAAGAACGGTGAGTTTCTATTTCGCAGTCGGCTGATCTGT
GTGAAATCTTAATAAAGGGTCCAATTACCAATTTGAAACTCAGTTTGCGGCGTGGCCTATCC
GGCGAACTTTTGGCCGTGATGGGCAGTTCCGGTGCCGAAAGACGACCCTGCTGAATGCC
TTGCCTTTCGATCGCCGCAGGGCATCCAAGTATCGCCATCCGGGATGCGACTGCTCAATGGC
CAACCTGTGGACGCCAAGGAGATGCAGGCCAGGTGCGCCTATGTCCAGCAGGATGACCTCTT
TATCGGCTCCCTAACGGCCAGGGAACACCTGATTTTCCAGGCCATGGTGCAGGATGCCACGAC
ATCTGACCTATCGGCAGCGAGTGGCCCGCGTGGATCAGGTGATCCAGGAGCTTTCGCTCAGC
AAATGTCAGCACACGATCATCGGTGTGCCCGGAGGGTCAAAGGTCTGTCCGGCGGAGAAAG
GAAGCGTCTGGCATTTCGCTCCGAGGCACCTAACCGATCCGCCGCTTCTGATCTGCGATGAGC
CCACCTCCGGACTGGACTCATTACCGCCACAGCGTTCGTCAGGTGCTGAAGAAGCTGTCCG
CAGAAGGGCAAGACCGTCATCCTGACCATTATCAGCCGTCTTCCGAGCTGTTTGGAGCTCTT
TGACAAGATCCTTCTGATGGCCGAGGGCAGGGTAGCTTTCTTGGGCACTCCAGCGAAGCCG
TCGACTTCTTTTCTAGTGAGTTCGATGTGTTTATTAAGGGTATCTAGCATTACATTACATC
TCAACTCCTATCCAGCGTGGGTGCCAGTGTCTTACCAACTACAATCCGGCGGACTTTTACG
TACAGGTGTTGGCCGTTGTGCCCGGACGGGAGATCGAGTCCCGTGATCGGATCGCCAAGATA
TGCGACAATTTTGCTATTAGCAAAGTAGCCGGGATATGGAGCAGTTGTTGGCCACCAAAAA
TTTGGAGAAGCCACTGGAGCAGCCGGAGAATGGGTACACCTACAAGGCCACCTGGTTCATGC
AGTTCGGGGCGGTCCTGTGGCGATCCTGGCTGTCCGTGCTCAAGGAACCACTCCTCGTAAAA
GTGCGACTTATTCAGACAACGGTGAGTGGTTCAGTGAAACAAATGATATAACGCTTACAA
TTCTTGGAAACAAATTCGCTAGATTTTAGTTAGAATTGCCTGATTCCACACCCTTCTTAGTT
TTTTTCAATGAGATGTATAGTTTATAGTTTTGCAGAAAATAAATAAATTTTCAATTAACCTCGC
GAACATGTTGAAGATATGAATATTAATGAGATGCGAGTAACATTTTAATTTGCAGATGGTTG
CCATCTTGATTGGCCTCATCTTTTTGGGCCAACAACTCACGCAAGTGGGCGTGATGAATATC
AACGGAGCCATCTTCCCTCTTCCAGCAACATGACCTTTCAAACGTCTTTGCCACGATAAA
TGTAAGTCTTGTTTAGAATACATTTGCATATTAATAATTTACTAACTTTCTAATGAATCGAT
TCGATTTAGGTGTTACCTCAGAGCTGCCAGTTTTTATGAGGGAGGCCCGAAGTCGACTTTA
TCGCTGTGACACATACTTTCTGGGCAAAACGATTGCCGAATTACCGCTTTTTCTCACAGTGC
CACTGGTCTTCACGGCGATTGCCTATCCGATGATCGGACTGCGGGCCGGAGTGCTGCACTTC
TTCAACTGCCTGGCGCTGGTCACTCTGGTGGCCAATGTGTCAACGTCCTTCGGATATCTAAT
ATCCTGCGCCAGCTCCTCGACCTCGATGGCGCTGTCTGTGGGTCCGCCGGTTATCATAACCAT
TCCTGCTCTTTGGCGGCTTCTTCTTGAACCTCGGGCTCGGTGCCAGTATACCTCAAATGGTTG
TCGTACCTCTCATGGTTCCGTTACGCCAACGAGGGTCTGCTGATTAACCAATGGGCGGACGT
GGAGCCGGGCGAAATTAGCTGCACATCGTCAACACCACGTGCCCCAGTTCCGGGCAAGGTCA
TCCTGGAGACGCTTAACTTCTCCGCCCGGATCTGCCGCTGGACTACGTGGGTCTGGCCATT
CTCATCGTGAGCTTCCGGGTGCTCGCATATCTGGCTCTAAGACTTCGGGCCCGACGCAAGGA

GTAGCCGACATATATCCGAAATAACTGCTTGTTTTTTTTTTTTTACCATTATTACCATCGTGT
TTACTGTTTATTGCCCCCTCAAAAAGCTAATGTAATTATATTTGTGCCAATAAAAACAAGAT
ATGACCTATAGAATACAAGTATTTCCCCTTCGAACATCCCCACAAGTAGACTTTGGATTTGT
CTTCTAACCAAAAAGACTTACACACCTGCATACCTTACATCAAAAACCTCGTTTATCGCTACAT
AAAACACCGGGATATATTTTTTATATACATACTTTTCAAATCGCGCGCCCTCTTCATAATTC
ACCTCCACCACACCACGTTTCGTAGTTGCTCTTTCGCTGTCTCCCACCCGCTCTCCGCAACA
CATTCACCTTTTTGTTTCGACGACCTTGGAGCGACTGTCGTTAGTTCCGCGCGATTCCGGTTCGC
TCAAATGGTTCGGAGTGGTTCATTTTCGTCTCAATAGAAATTAGTAATAAATATTTGTATGTA
CAATTTATTTGCTCCAATATATTTGTATATATTTCCCTCACAGCTATATTTATTCTAATTTA
ATATTATGACTTTTTAAAGTAATTTTTTGTGACCTGTTCCGGAGTGATTAGCGTTACAATTTG
AACTGAAAGTGACATCCAGTGTGTTTTCCTTGTGTAGATGCATCTCAAAAAAATGGTGGGCA
TAATAGTGTGTTTATATATATCAAAAATAACAACATAATAATAAGAATACATTTAATTTA
GAAAATGCTTGGATTTCACTGGAAGTGGCTAGAGCTTAGGATTTAAATGCTTGCATGCCTG
CAGGTCCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAG
CGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACTCTAGCGAGCGCCGGAG
TATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACG
TCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGTA
AAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTA
CTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAAAGAGAACTCTGAATAGGGGAATTGGGA
ATTCGTTAACAGATCTGCTACCGGTATGgtaccATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTAC
CGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT
CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACCACC
GGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGCCTGCAGTGCTT
CGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA
CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCG
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCAACAAGTTTG
TACAAAAAAGCTGAACGAGAAACGTAAAATGATATAAATATCAATATATTAATTAGATTTT
GCATAAAAAACAGACTACATAACTGTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGGCGGCCGC
ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTTGAGTT
AGGATCCGTCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATAT
ACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGC
TCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGA
AAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCAT
CCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGTGAAGCTGGTGAATGGGATAGTGTTCACCCTTG
TTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACG
ATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACACCTGGCC
TATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTT
CACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTTACCATGG
GCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCC
GTTTGTGATGGCTTCCATGTTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTG
GCAGGCGGGGCGTAATCTAGAGGATCCGGCTTACTAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTT
GCGCGCTGATTTTTGCGGTATAAGAATATATACTGATATGTATAACCCGAAGTATGTCAAAAA
GAGGTATGCTATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCAGTTGCTCA
AGGCATATATGATGTCAATATCTCCGGTCTGGTAAGCACAACCATGCAGAATGAAGCCCGTC
GTCTGCGTGCCGAACGCTGGAAAGCGGAAAATCAGGAAGGGATGGCTGAGGTCCGCCGGTTT
ATTGAAATGAACGGCTCTTTTTGCTGACGAGAACAGGGGCTGGTGAAATGCAGTTTAAAGGTTT
ACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGAC
ACGCCCGGGCGACGGATGGTGTATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTTCAGATAAAGTCCC
CCGTGAACTTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATA
TGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAAT

GACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCTCCCTTATACA
CAGCCAGTCTGCAGGTCGACCATAGTGACTGGATATGTTGTGTTTTACAGTATTATGTAGTC
TGTTTTTTATGCAAAATCTAATTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTC
AGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGACGTAAGCTAGCCTAAGCGTCGCGCCACTTCAACGCTCG
ATGGGAGCGTCATTGGTGGGCGGGGTAACCGTCGAAATCAGTGTTTACGCTTCCAATCGCAA
CAAAAATTCAGTGCACACTGAAAAGCATAACGAAACGATGAAGATTGTACGAGAAACCAT
AAAGTATTTTATCCACAAAGACACGTATAGCAGAAAAGCCAAGTTAACTCGGCGATAAGTTG
TGTACACAAGAATAAAAATCGGCCAGATTCAGTGTTGTCAGAAATAAGAAAACCCCACTATGT
TTTTCTTTGCCTTTTCTTTCTCCAGCGATCATTCAATTTTCGTGGTGAAGAACGGGGTCATT
GCACGGAGTTTCAGTGCAGGAAAGCAGAGCTGCCGTTCACTTCGTCTATAATTAGCGCTTT
CTATTTTCCCCGATTCCGGGCCGCTGCTGCGCTTTTCCGCTGCTGTTTGTGGCAAGTGTAGC
AGCAGGCTGTGCACGCAGTGTGGCATGCACTTGGCTTTCCACCGTTGGTATCGATTCTCTGG
GACGATGAGTCATTCCCTTTCCGGGGCCACAGCATAATCGTTGCCAGCTCACCAGAAATGGTGAC
TTCATTTCTTAACTGCCGTCAAGCATGCGATTGTACATAACATATTTATATATGTACAT
ATTTATGTGACTATGGTAGGTCGATATAATAGCAATCAACGCAAGCAAATGTGTCAGTCCTG
CTTACAGGAACGATTCTATTTAGTAATTTTCGTTGTATAAAGTAATTATGTATGTATGTAAG
CCCCATAAATCTGAAACAATTAGGCAAAACCATGCGAAGCTCTCGAGCTCGGTAAGCTTAGA
TCCACTAGTGTGACGATGTAGGTCACGGTCTCGAAGCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGCGTGC
CCTTGGGCTCCCCGGGCGGTAAGTCCACCTCACCCATCTGGTCCATCATGATGAACGGGTGC
AGGTGGCGGTAGTTGATCCCGGCGAACGCGCGGCACCCGGGAAGCCCTCGCCCTCGAAACC
GCTGGGCGCGGTGGTACGGTGAGCACGGGACGTGCGACGGCGTCCGGCGGGTGCAGGATACGC
GGGGCAGCGTCAGCGGGTCTCGACGGTACGGCGGGCATGTGACACTAGTTCTAGCCAGC
TTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATAACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT
TTCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG
CGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTC
GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
CGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCC
TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGC
TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCCTGCGCCTTATCC
GGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGC
CTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT
TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGA
TTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTA
AAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT
CAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTG
CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCG
CCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC
GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCA
TGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCC
GCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGT
AAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTA

AAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
 GAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
 CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCG
 ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
 TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT
 CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

>pUASg.VC155_GW.attB (10,554 bp)



ATGTA	white
CGGAG	5x UAS
CGCCG	hsp70 Promotor
ATGGT	VC155
ACAAG	attR
ATGGA	CmR (Chloramphenicol Resistenz)
ATGCA	ccdB Gen
ACTAA	alpha tubulin trailer

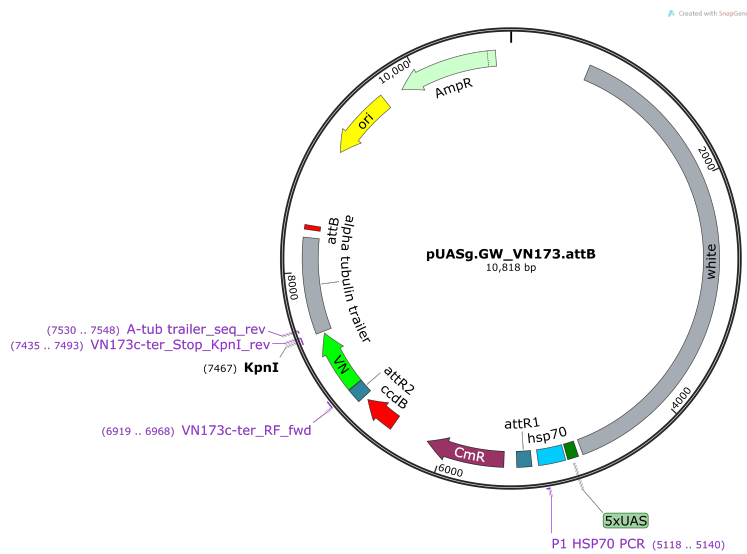
CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCAT
 TTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATA
 GGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT
 CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAA
 GTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
 AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGC
 GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACCCCGCCGCGC
 TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG
 CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
 ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT
 TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGTACCGGGCCCCTAGTATGTATGTAAGT
 TAATAAAACCCATTTTTGCGGAAAGTAGATAAAAAAACATTTTTTTTTTTTACTGCACTGG
 ATATCATTGAACTTATCTGATCAGTTTTAAATTTACTTCGATCCAAGGGTATTTGATGTACC
 AGGTTCTTTCGATTACCTCTCACTCAAATGACATTCCTCAAGTCAGCGCTGTTTGCCT
 CCTTCTGTCCACAGAAATATCGCCGTCTCTTTCGCCGCTGCGTCCGCTATCTCTTTCGCC
 ACCGTTTGTAGCGTTACGTAGCGTCAATGTCCGCCTTCAGTTGCATTTTGTTCAGCGGTTTCG

TGACGAAGCTCCAAGCGGTTTACGCCATCAATTAAACACAAAGTGCTGTGCCAAAACCTCCTC
TCGCTTCTTATTTTTGTTTGTGTTTTTGGAGTGATTGGGGTGGTGGATTGGTTTTGGGTGGGTAA
GCAGGGGAAAGTGTGAAAAATCCCGGCAATGGGCCAAGAGGATCAGGAGCTATTAATTCGCG
GAGGCAGCAAACACCCATCTGCCGAGCATCTGAACAATGTGAGTAGTACATGTGCATACATC
TTAAGTTCACTTGATCTATAGGAACTGCGATTGCAACATCAAATTGTCTGCGGCGTGAGAAC
TGCGACCCACAAAAATCCCAAACCGCAATTGCACAAAACAAATAGTGACACGAAACAGATTAT
TCTGGTAGCTGTTCTCGCTATATAAGACAATTTTTGAGATCATATCATGATCAAGACATCTA
AAGGCATTCATTTTCGACTATATTCTTTTTTACAAAAAATAAACAACCAGATATTTTAAGC
TGATCCTAGATGCACAAAAATAAATAAAAGTATAAACCTACTTTCGTAGGATACTTCGGGGT
ACTTTTTGTTTCGGGGTTAGATGAGCATAACGCTTGAGTTGATATTTGAGATCCCCTATCAT
TGCAGGGTGACAGCGGAGCGGCTTCGCAGAGCTGCATTAACCAGGGCTTCGGGCAGGCCAAA
AACTACGGCACGCTCCGGCCACCCAGTCCGCCGGAGGACTCCGGTTCAGGGAGCGGCCAACT
AGCCGAGAACCTCACCTATGCCGTCACAATATGGACATCTTTGGGGCGGTCAATCAGCCGG
GCTCCGGATGGCGGCAGCTGGTCAACCGGACACGCGGACTATTCTGCAACGAGCGACACATA
CCGGCGCCAGGAAACATTTGCTCAAGAACGGTGAGTTTCTATTTCGAGTCGGCTGATCTGT
GTGAAATCTTAATAAAGGGTCCAATTACCAATTTGAAACTCAGTTTGCGGCGTGGCCTATCC
GGCGAACTTTTGCCGTGATGGGCAGTTCCGGTGCCGAAAGACGACCCCTGCTGAATGCC
TTGCCTTTCGATCGCCGCAGGGCATCCAAGTATCGCCATCCGGGATGCGACTGCTCAATGGC
CAACCTGTGGACGCCAAGGAGATGCAGGCCAGGTGCGCCTATGTCCAGCAGGATGACCTCTT
TATCGGCTCCCTAACGGCCAGGGAACACCTGATTTTCCAGGCCATGGTTCGGATGCCACGAC
ATCTGACCTATCGGCAGCGAGTGGCCCGCGTGGATCAGGTGATCCAGGAGCTTTCGCTCAGC
AAATGTCAGCACACGATCATCGGTGTGCCCGGACGGGTGAAAGGTCTGTCCGGCGGAGAAAG
GAAGCGTCTGGCATTTCGCTCCGAGGCACTAACCGATCCGCCGCTTCTGATCTGCGATGAGC
CCACCTCCGGACTGGACTCATTTACCGCCACAGCGTCGTCCAGGTGCTGAAGAAGCTGTGCG
CAGAAGGGCAAGACCGTCATCTGACCATTATCAGCCGTCTTCCGAGCTGTTTGGAGCTCTT
TGACAAGATCCTTCTGATGGCCGAGGGCAGGGTAGCTTTCTTGGGCACTCCAGCGAAGCCG
TCGACTTCTTTTCTAGTGAGTTCGATGTGTTTATTAAGGGTATCTAGCATTACATTACATC
TCAACTCCTATCCAGCGTGGGTGCCAGTGTCTTACCAACTACAATCCGGCGGACTTTTACG
TACAGGTGTTGGCCGTGTGCCCGGACGGGAGATCGAGTCCCGTGATCGGATCGCCAAGATA
TGCGACAATTTTGCTATTAGCAAAGTAGCCCGGGATATGGAGCAGTTGTTGGCCACCAAAAA
TTTGGAGAAGCCACTGGAGCAGCCGGAGAATGGGTACACCTACAAGGCCACCTGGTTCATGC
AGTTCCGGGCGGTCCTGTGGCGATCCTGGCTGTCCGGTGTCAAGGAACCACTCCTCGTAAAA
GTGCGACTTATTCAGACAACGGTGAGTGGTTCAGTGGAACAAATGATATAACGCTTACAA
TTCTTGGAAACAAATTCGCTAGATTTTGTAGTATGAAATGCTGATTCCACACCCTTCTTAGTT
TTTTTCAATGAGATGTATAGTTTATAGTTTTGCAGAAAATAAATAAATTTCAATTAACCTGC
GAACATGTTGAAGATATGAATATTAATGAGATGCGAGTAACATTTAATTTGCAGATGGTTG
CCATCTTGATTGGCCTCATCTTTTTGGGCCAACAACTCACGCAAGTGGGCGTGATGAATATC
AACGGAGCCATCTTCCCTCTTCCGACCAACATGACCTTTCAAACGTCTTTGCCACGATAAA
TGTAAGTCTTGTGTTAGAATACATTTGCATATTAATAATTTACTAACTTTCTAATGAATCGAT
TCGATTTAGGTGTTTACCTCAGAGCTGCCAGTTTTTATGAGGGAGGCCCGAAGTCGACTTTA
TCGCTGTGACACATACTTTCTGGGCAAAACGATTGCCGAATTACCGCTTTTTTCTCACAGTGC
CACTGGTCTTTCAGGCGATTGCCTATCCGATGATCGGACTGCGGGCCGGAGTGTGCACTTC
TTCAACTGCCTGGCGCTGGTCACTCTGGTGGCCAATGTGTCAACGTCCTTCGGATATCTAAT
ATCCTGCGCCAGCTCCTCGACCTCGATGGCGCTGTCTGTGGGTCCGCCGTTATCATAACCAT
TCTTGCTCTTTGGCGGCTTCTTCTTGAACCTCGGGCTCGGTGCCAGTATACCTCAAATGGTTG
TCGTACCTCTCATGGTTCCGTTACGCCAACGAGGGTCTGCTGATTAACCAATGGGCGGACGT
GGAGCCGGGCGAAATTAGCTGCACATCGTGAACACCACGTGCCCCAGTTCGGGCAAGGTCA
TCTTGAGACGCTTAACTTCTCCGCCGCCGATCTGCCGCTGGACTACGTGGGTCTGGCCATT
CTCATCGTGAGCTTCCGGGTGCTCGCATATCTGGCTCTAAGACTTCGGGCCCGACGCAAGGA
GTAGCCGACATATATCCGAAATAACTGCTTGTTTTTTTTTTTTACCATTATTACCATCGTGT
TTACTGTTTATTGCCCCCTCAAAAAGCTAATGTAATTATATTTGTGCCAATAAAAACAAGAT
ATGACCTATAGAATACAAGTATTTCCCCTTCGAACATCCCCACAAGTAGACTTTGGATTTGT

CTTCTAACCAAAAGACTTACACACCTGCATACCTTACATCAAAAACCTCGTTTATCGCTACAT
AAAACACCGGGATATATTTTTTATATACATACTTTTCAAATCGCGCGCCCTCTTCATAATTC
ACCTCCACCACACCACGTTTTCGTAGTTGCTCTTTTCGCTGTCTCCCACCCGCTCTCCGCAACA
CATTACCTTTTTGTTTCGACGACCTTGGAGCGACTGTCGTTAGTTCCGCGCGATTTCGGTTTCGC
TCAAATGGTTCCGAGTGGTTCATTTTCGTCTCAATAGAAATTAGTAATAAATATTTGTATGTA
CAATTTATTTGCTCCAATATATTTGTATATATTTCCCTCACAGCTATATTTATTCTAATTTA
ATATTATGACTTTTTTAAGGTAATTTTTTGTGACCTGTTTCGGAGTGATTAGCGTTACAATTTG
AACTGAAAGTGACATCCAGTGTTCCTTGTGTAGATGCATCTCAAAAAAATGGTGGGCA
TAATAGTGTGTTTATATATATCAAAAATAACAATAATAAAGAATACATTTAATTTA
GAAAATGCTTGGATTTCACTGGAAGTGGCTAGAGCTTAGGATTTAAATGCTTGCATGCCTG
CAGGTGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAG
CGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACTCTAGCGAGCGCCGGAG
TATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAAGTGAACACG
TCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGTA
AAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTA
CTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAAAGAGAACTCTGAATAGGGAATTGGGA
ATTCGTTAACAGATCTGCTACCGGTATGgtaccatgGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA
GGCCAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
AGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTAC
CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGT
GACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTTTGTACAAAAAAGCTG
AACGAGAAACGTAAAATGATATAAATATCAATATATTAATTTAGATTTTGCATAAAAAACAG
ACTACATAATACTGTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGGCGCCGCATTAGGCACCCCA
GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTTGAGTTAGGATCCGTCGAG
ATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATA
TATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAAGTTGCTCAATGTACCTAT
AACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAA
GTTTTATCCGGCCTTTATTACATTTCTGCCCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGTA
TGGCAATGAAAGACGGTGGAGCTGGTGGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTC
CATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTT
TCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACCTGGCCTATTTCCCTAAAG
GGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGAT
TTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTATAC
GCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCT
TCCATGTCCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGCGGGGCGT
AATCTAGAGGATCCGGCTTACTAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTTGCGCGCTGATTTT
TGCGGTATAAGAATATATACTGATATGTATACCCGAAGTATGTCAAAAAGAGGTATGCTATG
AAGCAGCGTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCAGTTGCTCAAGGCATATATGAT
GTCAATATCTCCGGTCTGGTAAGCACAACCATGCAGAATGAAGCCCGTCTGCTGCGTGCCGA
ACGCTGGAAAGCGGAAAATCAGGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCCGGTTTATTGAAATGAACG
GCTTTTTGCTGACGAGAACAGGGGCTGGTGAAATGCGAGTTTAAGGTTTACACCTATAAAAAG
AGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCCGGGCGAC
GGATGGTGTATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTGATGATAAAGTCCCCCGTGAACCTTAC
CCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTGCC
GGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGACATCAAAAACG
CCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTGTCAGGCTCCCTTATACACAGCCAGTCTGCA
GGTCGACCATAGTACTGGATATGTTGTGTTTTACAGTATTATGTAGTCTGTTTTTTATGCA
AAATCTAATTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAGCTTTCTTGTA
AAAGTGGTGACGTAAGCTAGCACTAAGCGTTCGCGCCACTTCAACGCTCGATGGGAGCGTCAT
TGGTGGGCGGGTAACCGTCGAAATCAGTGTTCACGCTTCCAATCGCAACAAAAAATTCACT
GCAACACTGAAAAGCATAACGAAAACGATGAAGATTGTACGAGAAACCATAAAGTATTTTATC
CACAAAGACACGTATAGCAGAAAAGCCAAGTTAACTCGGCGATAAGTTGTGTACACAAGAAT

AAAATCGGCCAGATTTCAGTGTGTCAGAAATAAGAAAACCCCACTATGTTTTTCTTTGCCTT
TTCTTTCTCCCAGCGATCATTCAATTCGTGGTGAAAGAACGGGGTCATTGCACGGAGTTTCG
ACTGCGGGAAAGCAGAGCTGCCGTTCACTTCGTCTATAATTAGCGCTTTCTATTTTCCCCGA
TTCGGGCCGCTGCTGCGCTTTTCCGCCTGCTGTTTGTGGCAAGTGTAGCAGCAGGCTGTGCA
CGCAGTGTGGCATGCACTTGGCTTTCCACCGTTGGTATCGATTCTCTGGGACGATGAGTCAT
TCCTTTCGGGGCCACAGCATAATCGTTGCCAGCTCACCGAAATGGTGACTTCATTTCTTAAC
TGCCGTCAAGCATGCGATTGTACATACATACATATTTATATATGTACATATTTATGTGACTA
TGGTAGGTCGATATAATAGCAATCAACGCAAGCAAATGTGTCAGTCCTGCTTACAGGAACGA
TTCTATTTAGTAATTTTCGTTGTATAAAGTAATTATGTATGTATGTAAGCCCCATAAATCTG
AAACAATTAGGCAAACCATGCGAAGCTCTCGAGCTCGGTAAGCTTAGATCCACTAGTGTGCG
ACGATGTAGGTCACGGTCTCGAAGCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCC
GGGCGGTA CTCCACCTCACCCATCTGGTCCATCATGATGAACGGGTCGAGGTGGCGGTAGT
TGATCCCGGCGAACGCGCGGCGCACCGGGAAGCCCTCGCCCTCGAAACCGCTGGGCGCGGTG
GTCACGGTGAGCACGGGACGTGCGACGGCGTCGGCGGGTGCGGATACGCGGGGCAGCGTCAG
CGGGTTCTCGACGGTCACGGCGGGCATGTGACACTAGTTCTAGCCAGCTTTTGTTCCTTTT
AGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGT
TATCCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGC
CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATT
GGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCG
TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT
CTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG
GCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCT
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTA
CACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC
TGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTGCTTCATCCATAGTTGCCGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTA
TCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTT
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCT
TCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCAC
TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA
TTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCG
ATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAATAAGGGCGACACGGAAATGTT
GAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATG
AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
CCGAAAAGTGCCAC

>pUASg. GW_VN173.attB (10,818 bp)



ATGTA	white
CGGAG	5x UAS
CGCCG	hsp70 Promotor
ATGGT	VN173
ACAAG	attR
ATGGA	CmR (Chloramphenicol Resistenz)
ATGCA	ccdB Gen
ACTAA	alpha tubulin trailer

```

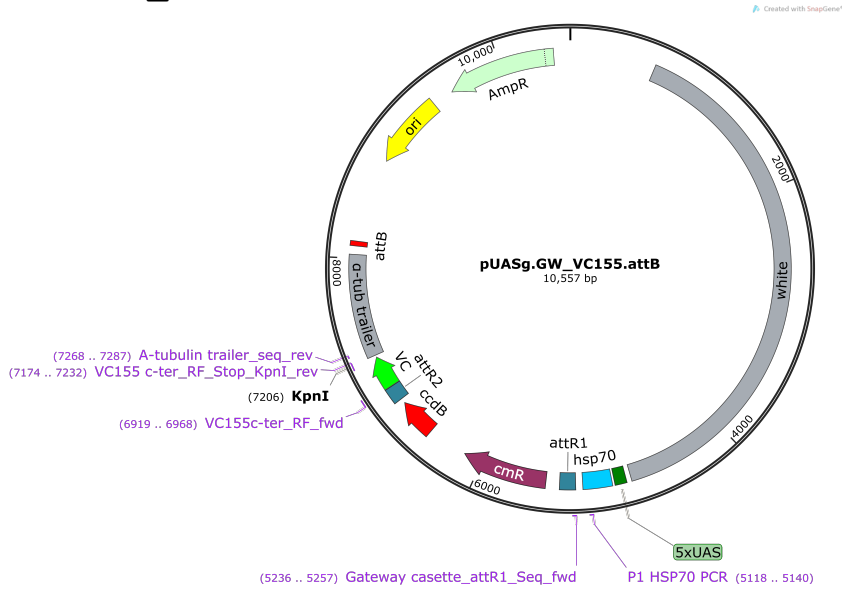
CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAATCAGCTCAT
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATA
GGTTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAA
GTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGC
GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACCCGCCGCGC
TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG
CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT
TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGTACCGGGCCCCTAGTATGTATGTAAGT
TAATAAAACCCATTTTTGCGGAAAGTAGATAAAAAAACATTTTTTTTTTTTACTGCACTGG
ATATCATTGAACCTATCTGATCAGTTTTAAATTTACTTCGATCCAAGGGTATTTGATGTACC
AGGTTCTTTCGATTACCTCTCACTCAAATGACATTCCTCAAGTCAGCGCTGTTTGCCT
CCTTCTCTGTCCACAGAAATATCGCCGCTCTCTTTCGCCGCTGCGTCCGCTATCTCTTTCGCC
ACCGTTTGTAGCGTTACGTAGCGTCAATGTCCGCCTTCAGTTGCATTTTGTGAGCGGTTTCG
TGACGAAGCTCCAAGCGGTTTACGCCATCAATTAACACAAAGTGCTGTGCCAAAACCTCCTC
TCGTTCTTATTTTTGTTTGTGTTTTTGGAGTGATTGGGGTGGTATTGGTTTTGGGTGGGTAA
GCAGGGGAAAGTGTGAAAAATCCCGCAATGGGCCAAGAGGATCAGGAGCTATTAATTCGCG
GAGGCAGCAAACCCCATCTGCCGAGCATCTGAACAATGTGAGTAGTACATGTGCATACATC
TTAAGTTCACCTTGATCTATAGGAACTGCGATTGCAACATCAAATTGTCTGCGGCGTGAGAAC
TGCGACCCACAAAATCCCAAACCGCAATTGCACAAACAAATAGTGACACGAAACAGATTAT
TCTGGTAGCTGTTCTCGCTATATAAGACAATTTTTGAGATCATATCATGATCAAGACATCTA
AAGGCATTCATTTTCGACTATATTCTTTTTTACAAAAATATAACAACCAGATATTTAAGC
TGATCCTAGATGCACAAAAATAAATAAAAGTATAAACCTACTTCGTAGGATACTTCGGGGT
    
```

ACTTTTTGTTCTGGGGTTAGATGAGCATAACGCTTGTAGTTGATATTTGAGATCCCCTATCAT
TGCAGGGTGACAGCGGAGCGGCTTCGCAGAGCTGCATTAACCAGGGCTTCGGGCAGGCCAAA
AACTACGGCACGCTCCGGCCACCCAGTCCGCCGGAGGACTCCGGTTCAGGGAGCGGCCAACT
AGCCGAGAACCTCACCTATGCCTGGCACAATATGGACATCTTTGGGGCGGTCAATCAGCCGG
GCTCCGGATGGCGGCAGCTGGTCAACCGGACACGCGGACTATTCTGCAACGAGCGACACATA
CCGGCGCCCAGGAAACATTTGCTCAAGAACGGTGAGTTTCTATTTCGCAGTCGGCTGATCTGT
GTGAAATCTTAATAAAGGGTCCAATTACCAATTTGAAACTCAGTTTGCGGCGTGGCCTATCC
GGGCGAACTTTTGGCCGTGATGGGCAGTTCCGGTGCCGGAAAGACGACCCTGCTGAATGCC
TTGCCTTTCGATCGCCGCAGGGCATCCAAGTATCGCCATCCGGGATGCGACTGCTCAATGGC
CAACCTGTGGACGCCAAGGAGATGCAGGCCAGGTGCGCCTATGTCCAGCAGGATGACCTCTT
TATCGGCTCCCTAACGGCCAGGGAACACCTGATTTTCCAGGCCATGGTGC GGATGCCACGAC
ATCTGACCTATCGGCAGCGAGTGGCCCGCGTGGATCAGGTGATCCAGGAGCTTTCGCTCAGC
AAATGTCAGCACACGATCATCGGTGTGCCCGCAGGGTGAAAGGTCTGTCCGGCGGAGAAA
GAAGCGTCTGGCATTTCGCCTCCGAGGCACTAACCGATCCGCCGCTTCTGATCTGCGATGAGC
CCACCTCCGGACTGGACTCATTTACCGCCCACAGCGTTCGTCCAGGTGCTGAAGAAGCTGTGC
CAGAAGGGCAAGACCGTCATCCTGACCATTTCATCAGCCGTCTTCCGAGCTGTTTGAGCTCTT
TGACAAGATCCTTCTGATGGCCGAGGGCAGGGTAGCTTTCTTGGGCACTCCAGCGAAGCCG
TCGACTTCTTTTCTAGTGAGTTCGATGTGTTTATTAAGGGTATCTAGCATTACATTACATC
TCAACTCCTATCCAGCGTGGGTGCCAGTGTCTACCAACTACAATCCGGCGGACTTTTACG
TACAGGTGTTGGCCGTGTGCCCGGACGGGAGATCGAGTCCCGTGATCGGATCGCCAAGATA
TGCGACAATTTTGCTATTAGCAAAGTAGCCCGGGATATGGAGCAGTTGTTGGCCACCAAAAA
TTTGGAGAAGCCACTGGAGCAGCCGGAGAATGGGTACACCTACAAGGCCACCTGGTTCATGC
AGTTCGGGCGGTCTGTGGCGATCCTGGCTGTCCGTGCTCAAGGAACCACTCCTCGTAAAA
GTGCGACTTATTTCAGACAACGGTGAGTGGTTCAGTGGAACAAATGATATAACGCTTACAA
TTCTTGGAACAAATTCGCTAGATTTTAGTTAGAATTGCCTGATTCCACACCCTTCTTAGTT
TTTTTCAATGAGATGTATAGTTTATAGTTTTGCAGAAAATAAATAAATTTCAATTAACCTCGC
GAACATGTTGAAGATATGAATATTAATGAGATGCGAGTAACATTTTAATTTGCAGATGGTTG
CCATCTTGATTGGCCTCATCTTTTTGGGCCAACAACTCACGCAAGTGGGCGTGATGAATATC
AACGGAGCCATCTTCCCTCTTCTGACCAACATGACCTTTCAAACGCTTTTGCCACGATAAA
TGTAAGTCTTGTTTAGAATACATTTGCATATTAATAATTTACTAACTTTCTAATGAATCGAT
TCGATTTAGGTGTTACCTCAGAGCTGCCAGTTTTTTATGAGGGAGGCCCGAAGTCGACTTTA
TCGCTGTGACACATACTTTCTGGGCAAACGATTGCCGAATTACCGCTTTTTCTCACAGTGC
CACTGGTCTTCACGGCGATTGCCTATCCGATGATCGGACTGCGGGCCGGAGTGCTGCACTTC
TTCAACTGCCTGGCGCTGGTCACTCTGGTGGCCAATGTGTCAACGTCCTTCGGATATCTAAT
ATCCTGCGCCAGCTCCTCGACCTCGATGGCGCTGTCTGTGGGTCCGCCGGTTATCATACCAT
TCCTGCTCTTTGGCGGCTTCTTCTTGAACCTCGGGCTCGGTGCCAGTATACCTCAAATGGTTG
TCGTACCTCTCATGGTTCCGTTACGCCAACGAGGGTCTGCTGATTAACCAATGGGCGGACGT
GGAGCCGGGCGAAATTAGCTGCACATCGTGAACACCACGTGCCCCAGTTCGGGCAAGGTCA
TCCTGGAGACGCTTAACTTCTCCGCCCGGATCTGCCGCTGGACTACGTGGGTCTGGCCATT
CTCATCGTGAGCTTCCGGGTGCTCGCATATCTGGCTCTAAGACTTCGGGCCCAGCGCAAGGA
GTAGCCGACATATATCCGAAATAACTGCTTGTTTTTTTTTTTTACCATTATTACCATCGTGT
TTACTGTTTATTGCCCCCTCAAAAAGCTAATGTAATTAATTTGTGCCAATAAAAACAAGAT
ATGACCTATAGAATACAAGTATTTCCCCTTCGAACATCCCCACAAGTAGACTTTGGATTTGT
CTTCTAACCAAAAAGACTTACACACCTGCATACCTTACATCAAAAACCTCGTTTATCGCTACAT
AAAACACCGGGATATATTTTTTATATACATACTTTTCAAATCGCGCGCCCTCTTCATAATTC
ACCTCCACCACACCACGTTTTCGTAGTTGCTCTTTTCGCTGTCTCCCACCCGCTCTCCGCAACA
CATTCACCTTTTGTTCGACGACCTTGGAGCGACTGTCGTTAGTTCCGCGCGATTCCGGTTCGC
TCAAATGGTTCAGAGTGGTTCATTTCTGCTCTCAATAGAAATTAGTAATAAATAATTTGTATGTA
CAATTTATTTGCTCCAATATATTTGTATATATTTCCCTCACAGCTATATTTATTCTAATTTA
ATATTATGACTTTTTTAAGGTAATTTTTTGTGACCTGTTCCGAGTGATTAGCGTTACAATTTG
AACTGAAAGTGACATCCAGTGTTCCTTGTGTAGATGCATCTCAAAAAAATGGTGGGCA
TAATAGTGTGTTTATATATATCAAAAATAACAACCTATAATAATAAGAATACATTTAATTTA

GAAAATGCTTGGATTTCACTGGAAGCTAGGCTAGAGCTTAGGATTTAAATGCTTGCATGCCTG
CAGGTGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAG
CGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGACTCTAGCGAGCGCCGGAG
TATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACG
TCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGTA
AAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTA
CTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAAAGAGAGAACTCTGAATAGGGAATTGGGA
ATTCGTTAACAGATCTGCTACCGGTATACAAGTTTTGTACAAAAAAGCTGAACGAGAAACGTA
AAATGATATAAATATCAATATATTAATTTAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACATAATACT
GTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGGCGCCGCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTT
ATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTTGTAGTTAGGATCCGTCGAGATTTTCAGGAGCT
AAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCA
TCGTAAAGAACATTTTGGAGGCATTTCACTCAGTTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTC
AGCTGGATATTACGGCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCC
TTTATTACATTTCTTGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCCGTATGGCAATGAAAGA
CGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTTCCATGAGCAAACCTG
AAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAA
TATGTTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCA
ATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAG
GTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTCATCATGCCGTTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAG
AATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGCGGGCGTAATCTAGAGGATC
CGGCTTACTAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTTGCGCGCTGATTTTTTGCGGTATAAGAA
TATATACTGATATGTATACCCGAAGTATGTCAAAAAGAGGTATGCTATGAAGCAGCGTATTA
CAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCAGTTGCTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCG
GTCTGGTAAGCACAAACCATGCAGAATGAAGCCCGTCGTCTGCGTGCCGAACGCTGGAAAGCG
GAAAATCAGGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCCGGTTTTATTGAAATGAACGGCTCTTTTGCTGA
CGAGAACAGGGGCTGGTGAAATGCAGTTTAAAGTTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTAT
CGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGAATATTATTGACACGCCCGGGCGACGGATGGTGATCCC
CCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCCCCCGTGAACCTTACCCGGTGGTGACATA
TCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATC
GGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGAT
GTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCTCCCTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTGCACCATAGT
GACTGGATATGTTGTGTTTTTACAGTATTATGTAGTCTGTTTTTTTATGCAAAATCTAATTTAA
TATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTTCTCGTTCACTTTCTTGTACAAAGTGGTGACGA
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGC
GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGA
CCACCCTGGGCTACGGCCTGCAGTGTCTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC
TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA
CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
TACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAAGT
CAAGATCCGCCACAACATCtagGGTACCTAAGCTAGCACTAAGCGTCGCGCCACTTCAACGC
TCGATGGGAGCGTCATTGGTGGGCGGGGTAACCGTCGAAATCAGTGTTTACGCTTCCAATCG
CAACAAAAAATTCCTGCAACACTGAAAAGCATAACGAAAACGATGAAGATTGTACGAGAAAC
CATAAAGTATTTTATCCACAAAGACACGTATAGCAGAAAAGCCAAGTTAACTCGGCGATAAG
TTGTGTACACAAGAATAAAATCGGCCAGATTCAGTGTGTGTCAGAAAATAAGAAAACCCCACTA
TGTTTTTCTTTGCCTTTTCTTTCTCCCAGCGATCATTTCATTTTCGTGGTGAAGAACGGGGTC
ATTGCACGGAGTTTTCGACTGCGGGAAAGCAGAGCTGCCGTTCACTTCGTCTATAAATTAGCGC
TTTCTATTTTCCCGATTCGGGCGCTGCTGCGTTTTTCCGCTGCTGTTTGTGGCAAGTGT
AGCAGCAGGCTGTGCACGCAGTGTGGCATGCACTTGGCTTTCCACCGTTGGTATCGATTCTC

TGGGACGATGAGTCATTCCTTTTCGGGGCCACAGCATAATCGTTGCCAGCTCACCGAAATGGT
GACTTCATTTCTTAACTGCCGTCAAGCATGCGATTGTACATACATATATTTATATATGTA
CATATTTATGTGACTATGGTAGGTTCGATATAATAGCAATCAACGCAAGCAAATGTGTCAGTC
CTGCTTACAGGAACGATTCTATTTAGTAATTTTCGTTGTATAAAGTAATTATGTATGTATGT
AAGCCCCATAAATCTGAAACAATTAGGCCAAAACCATGCGAAGCTCTCGAGCTCGGTAAGCTT
AGATCCACTAGTGTGACGATGTAGGTACGGTCTCGAAGCCGCGGTGCGGGTGCAGGGCG
TGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGTACTCCACCTCACCCATCTGGTCCATCATGATGAACGGG
TCGAGGTGGCGGTAGTTGATCCCGGCGAACGCGCGGCGCACCGGGAAGCCCTCGCCCTCGAA
ACCGCTGGGCGCGGTGGTCACGGTGAGCACGGGACGTGCGACGGCGTCGGCGGGTGC GGATA
CGCGGGGCAGCGTCAGCGGGTCTCGACGGTCACGGCGGGCATGTGACACTAGTTCTAGCC
AGCTTTTGTTCCTTTTAGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTT
TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG
AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCG
TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA
GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC
GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGA
AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCT
CCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTA
TCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTT
ACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA
TCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAAT
CTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
TCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACT
ACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTC
CTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTC
GTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
CCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTG
GCCGACGTTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTTACTGTCATGCCATC
CGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGC
GGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACT
TTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCT
GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTT
TCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATATTGAAGCATTTATCA
GGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGG
TTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

>pUASg.GW_VC155.attB (10,557 bp)



ATGTA	white
CGGAG	5x UAS
CGCCG	hsp70 Promotor
ATGGT	VC155
ACAAG	attR
ATGGA	CmR (Chloramphenicol Resistenz)
ATGCA	ccdB Gen
ACTAA	alpha tubulin trailer

```

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCAT
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATA
GGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAA
GTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGC
GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC
TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG
CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT
TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGTACCGGGCCCCTAGTATGTATGTAAGT
TAATAAAACCCATTTTTGCGGAAAGTAGATAAAAAAACATTTTTTTTTTTTACTGCACTGG
ATATCATTGAACTTATCTGATCAGTTTTAAATTTACTTTCGATCCAAGGGTATTTGATGTACC
AGGTTCTTTCGATTACCTCTCACTCAAATGACATTCCTCACTCAAAGTCAGCGCTGTTTGCCT
CCTTCTCTGTCCACAGAAATATCGCCGTCTCTTTCGCCGCTGCGTCCGCTATCTCTTTCGCC
ACCGTTTGTAGCGTTACGTAGCGTCAATGTCCGCCTTCAGTTGCATTTTGTGTCAGCGGTTTCG
TGACGAAGCTCCAAGCGGTTTACGCCATCAATTAACACAAAGTGCTGTGCCAAAACCTCCTC
TCGCTTCTTATTTTTGTTTGTTTTTTGTAGTGATTGGGGTGGTGTATTGGTTTTGGGTGGGTAA
GCAGGGGAAAGTGTGAAAAATCCCGGCAATGGGCCAAGAGGATCAGGAGCTATTAATTCGCG
GAGGCAGCAAACCCCATCTGCCGAGCATCTGAACAATGTGAGTAGTACATGTGCATACATC
TTAAGTTCACTTGATCTATAGAACTGCGATTGCAACATCAAATTGTCTGCGGCGTGAGAAC
TGCGACCCACAAAATCCCAAACCGCAATTGCACAAACAAATAGTGACACGAAACAGATTAT
TCTGGTAGCTGTTCTCGCTATATAAGACAATTTTTGAGATCATATCATGATCAAGACATCTA
AAGGCATTCATTTTCGACTATATTCTTTTTTACAAAAATATAACAACCAGATATTTTAAGC
TGATCCTAGATGCACAAAAATAAATAAAAGTATAAACCTACTTCGTAGGATACTTCGGGGT
    
```

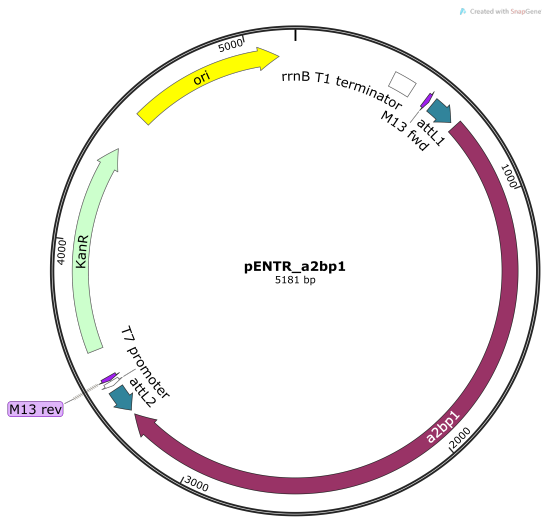
ACTTTTTGTTCTGGGGTTAGATGAGCATAACGCTTGTAGTTGATATTTGAGATCCCCTATCAT
TGCAGGGTGACAGCGGAGCGGCTTCGCAGAGCTGCATTAACCAGGGCTTCGGGCAGGCCAAA
AACTACGGCACGCTCCGGCCACCCAGTCCGCCGGAGGACTCCGGTTCAGGGAGCGGCCAACT
AGCCGAGAACCTCACCTATGCCTGGCACAATATGGACATCTTTGGGGCGGTCAATCAGCCGG
GCTCCGGATGGCGGCAGCTGGTCAACCGGACACGCGGACTATTCTGCAACGAGCGACACATA
CCGGCGCCCAGGAAACATTTGCTCAAGAACGGTGAGTTTCTATTTCGCAGTCCGGCTGATCTGT
GTGAAATCTTAATAAAGGGTCCAATTACCAATTTGAAACTCAGTTTGCGGCGTGGCCTATCC
GGGCGAACTTTTGGCCGTGATGGGCAGTTCCGGTGCCGGAAAGACGACCCTGCTGAATGCC
TTGCCTTTTCGATCGCCGCAGGGCATCCAAGTATCGCCATCCGGGATGCGACTGCTCAATGGC
CAACCTGTGGACGCCAAGGAGATGCAGGCCAGGTGCGCCTATGTCCAGCAGGATGACCTCTT
TATCGGCTCCCTAACGGCCAGGGAACACCTGATTTTCCAGGCCATGGTGC GGATGCCACGAC
ATCTGACCTATCGGCAGCGAGTGGCCCGCGTGGATCAGGTGATCCAGGAGCTTTCGCTCAGC
AAATGTCAGCACACGATCATCGGTGTGCCCGCAGGGTGAAAGGTCTGTCCGGCGGAGAAA
GAAGCGTCTGGCATTTCGCTCCGAGGCACTAACCGATCCGCCGCTTCTGATCTGCGATGAGC
CCACCTCCGGACTGGACTCATTTACCGCCCACAGCGTTCGTCCAGGTGCTGAAGAAGCTGTGC
CAGAAGGGCAAGACCGTCATCCTGACCATTCATCAGCCGTCTTCCGAGCTGTTTGGAGCTCTT
TGACAAGATCCTTCTGATGGCCGAGGGCAGGGTAGCTTTCTTGGGCACTCCAGCGAAGCCG
TCGACTTCTTTTCTAGTGAGTTCGATGTGTTTATTAAGGGTATCTAGCATTACATTACATC
TCAACTCCTATCCAGCGTGGGTGCCAGTGTCTACCAACTACAATCCGGCGGACTTTTACG
TACAGGTGTTGGCCGTGTGCCCGGACGGGAGATCGAGTCCCGTGATCCGATCGCCAAGATA
TGCGACAATTTTGCTATTAGCAAAGTAGCCCGGGATATGGAGCAGTTGTTGGCCACCAAAAA
TTTGGAGAAGCCACTGGAGCAGCCGGAGAATGGGTACACCTACAAGGCCACCTGGTTCATGC
AGTTCGGGCGGTCTGTGGCGATCCTGGCTGTCCGGTGTCAAGGAACCACTCCTCGTAAAA
GTGCGACTTATTAGACAACGGTGAGTGGTTCAGTGGAACAAATGATATAACGCTTACAA
TTCTTGGAACAAATTCGCTAGATTTTAGTTAGAATTGCCTGATTCCACACCCTTCTTAGTT
TTTTTCAATGAGATGTATAGTTTATAGTTTTGCAGAAAATAAATAAATTTCAATTAACCTCGC
GAACATGTTGAAGATATGAATATTAATGAGATGCGAGTAACATTTTAATTTGCAGATGGTTG
CCATCTTGATTGGCCTCATCTTTTTGGGCCAACAACTCACGCAAGTGGGCGTGATGAATATC
AACGGAGCCATCTTCTCTTCTGACCAACATGACCTTTCAAACGCTTTTGCCACGATAAA
TGTAAGTCTTGTTTAGAATACATTTGCATATTAATAATTTACTAACTTTCTAATGAATCGAT
TCGATTTAGGTGTTACCTCAGAGCTGCCAGTTTTTTATGAGGGAGGCCCGAAGTCGACTTTA
TCGCTGTGACACATACTTTCTGGGCAAACGATTGCCGAATTACCGCTTTTTCTCACAGTGC
CACTGGTCTTCACGGCGATTGCCTATCCGATGATCGGACTGCGGGCCGGAGTGCTGCACTTC
TTCAACTGCCTGGCGCTGGTCACTCTGGTGGCCAATGTGTCAACGTCCTTCGGATATCTAAT
ATCCTGCGCCAGCTCCTCGACCTCGATGGCGCTGTCTGTGGGTCCGCCGGTTATCATACCAT
TCCTGCTCTTTGGCGGCTTCTTCTTGAACCTCGGGCTCCGGTGCAGTATACCTCAAATGGTTG
TCGTACCTCTCATGGTTCCGTTACGCCAACGAGGGTCTGCTGATTAACCAATGGGCGGACGT
GGAGCCGGGCGAAATTAGCTGCACATCGTGAACACCACGTGCCCCAGTTCGGGCAAGGTCA
TCCTGGAGACGCTTAACTTCTCCGCCCGGATCTGCCGCTGGACTACGTGGGTCTGGCCATT
CTCATCGTGAGCTTCCGGGTGCTCGCATATCTGGCTCTAAGACTTCGGGCCCCGACGCAAGGA
GTAGCCGACATATATCCGAAATAACTGCTTGTTTTTTTTTTTTACCATTATTACCATCGTGT
TTACTGTTTATTGCCCCCTCAAAAAGCTAATGTAATTAATTTGTGCCAATAAAAACAAGAT
ATGACCTATAGAATACAAGTATTTCCCCTTCGAACATCCCCACAAGTAGACTTTGGATTTGT
CTTCTAACCAAAAAGACTTACACACCTGCATACCTTACATCAAAAACCTCGTTTATCGCTACAT
AAAACACCGGGATATATTTTTTATATACATACTTTTCAAATCGCGCGCCCTCTTCATAATTC
ACCTCCACCACACCACGTTTTCGTAGTTGCTCTTTTCGCTGTCTCCCACCCGCTCTCCGCAACA
CATTCACCTTTTGTTCGACGACCTTGGAGCGACTGTCGTTAGTTCCGCGCGATTCCGGTTCGC
TCAAATGGTTCAGAGTGGTTCATTTCTGCTCAATAGAAATTAGTAATAAATAATTTGTATGTA
CAATTTATTTGCTCCAATATATTTGTATATATTTCCCTCACAGCTATATTTATTCTAATTTA
ATATTATGACTTTTTTAAGGTAATTTTTTGTGACCTGTTCCGAGTGATTAGCGTTACAATTTG
AACTGAAAGTGACATCCAGTGTTCCTTGTGTAGATGCATCTCAAAAAAATGGTGGGCA
TAATAGTGTGTTTATATATATCAAAAATAACAACCTATAATAATAAGAATACATTTAATTTA

GAAAATGCTTGGATTTCACTGGAAGCTAGGCTAGAGCTTAGGATTTAAATGCTTGCATGCCTG
CAGGTGGAGTACTGTCCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCCTCCGAG
CGGAGTACTGTCCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCCTCCGAGCGGAGACTCTAGCGAGCGCCGGAG
TATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACG
TCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGTA
AAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTTAAAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTA
CTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAAAGAGAGAACTCTGAATAGGGAATTGGGA
ATTCGTTAACAGATCTGCTACCGGTATACAAGTTTTGTACAAAAAAGCTGAACGAGAAACGTA
AAATGATATAAATATCAATATATTTAAATTAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACATAATACT
GTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGGCGCCGCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTT
ATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTTGTAGTTAGGATCCGTCGAGATTTTCAGGAGCT
AAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCA
TCGTAAAGAACATTTTGGAGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTC
AGCTGGATATTACGGCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCC
TTTATTACATTTCTTGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCCGTATGGCAATGAAAGA
CGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTG
AAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAA
TATGTTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCA
ATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAG
GTGCTGATGCCGCTGGCGATTCCAGGTTTCATCATGCCGTTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAG
AATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGCGGGCGTAATCTAGAGGATC
CGGCTTACTAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTTGCGCGCTGATTTTTGCGGTATAAGAA
TATATACTGATATGTATACCCGAAGTATGTCAAAAAGAGGTATGCTATGAAGCAGCGTATTA
CAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCAGTTGCTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCG
GTCTGGTAAGCACAAACCATGCAGAATGAAGCCCGTCGTCTGCGTGCCGAACGCTGGAAAGCG
GAAAATCAGGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCCGGTTTTATTGAAATGAACGGCTCTTTTGCTGA
CGAGAACAGGGGCTGGTGAAATGCAGTTTAAAGTTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTAT
CGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGAATATTATTGACACGCCCGGGCGACGGATGGTGATCCC
CCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCCCCCGTGAACCTTACCCGGTGGTGACATA
TCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATC
GGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGAT
GTTCTGGGGAATATAAATGTTCAGGCTCCCTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTGCACCATAGT
GACTGGATATGTTGTGTTTTTACAGTATTATGTAGTCTGTTTTTTTATGCAAAATCTAATTTAA
TATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTTCTCGTTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGACGa
tgGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
GGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT
GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGC
GCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
CTGTACtagggtaccTAAGCTAGCACTAAGCGTCGCGCCACTTCAACGCTCGATGGGAGCGT
CATTTGGTGGGCGGGGTAACCGTCAAAATCAGTGTTTACGCTTCCAATCGCAACAAAAAATTC
ACTGCAACACTGAAAAGCATAACGAAAACGATGAAGATTGTACGAGAAACCATAAAGTATTTTT
ATCCACAAAGACACGTATAGCAGAAAAGCCAAGTTAACTCGGCGATAAGTTGTGTACACAAG
AATAAAATCGGCCAGATTCAGTGTGTGAGAAAATAAGAAAACCCCACTATGTTTTTCTTTGC
CTTTTCTTTCTCCCAGCGATCATTCAATTTTCGTGGTGAAGAACGGGGTCATTGCACGGAGTT
TCGACTGCGGGAAAGCAGAGCTGCCGTTCACTTCGTCTATAATTAGCGCTTTCTATTTTTCCC
CGATTCGGGCGGCTGCTGCGCTTTTCCGCTGCTGTTTGTGGCAAGTGTAGCAGCAGGCTGT
GCACGCAGTGTGGCATGCACTTGGCTTTCCACCGTTGGTATCGATTCTCTGGGACGATGAGT
CATTCCTTTCCGGGGCCACAGCATAATCGTTGCCAGCTCACCAGAAATGGTGACTTCATTTCTT
AACTGCCGTCAAGCATGCGATTGTACATACATACATATTTATATATGTACATATTTATGTGA
CTATGGTAGGTCGATATAATAGCAATCAACGCAAGCAAATGTGTGAGTCTGCTTACAGGAA
CGATTCTATTTAGTAATTTTCGTTGTATAAAGTAATTATGTATGTATGTAAAGCCCCATAAAT

CTGAAACAATTAGGCAAAACCATGCGAAGCTCTCGAGCTCGGTAAGCTTAGATCCACTAGTG
TCGACGATGTAGGTCACGGTCTCGAAGCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTC
CCGGGGCGGCTACTCCACCTCACCCATCTGGTCCATCATGATGAACGGGTGAGAGTGGCGGT
AGTTGATCCC GGCGAACGCGCGGGCGCACC GGGAAGCCCTCGCCCTCGAAACCGCTGGGCGCG
GTGGTCACGGTGAGCACGGGACGTGCGACGGCGTGGCGGGTGCGGATACGCGGGGCAGCGT
CAGCGGGTCTCGACGGTCACGGCGGGCATGTGCGACACTAGTTCTAGCCAGCTTTTGTTCCT
TTTAGTGAGGGTTAATTTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAAT
TGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGG
TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGG
GAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTGCCT
ATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCG
AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTG
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGC
GTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAA
GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACACTATC
GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAA
GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGG
GTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAA
GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT
GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
TCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGAT
TTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATC
CGCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA
GTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATG
GCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAA
AAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTAT
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT
TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTG
CTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCA
TCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
TCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTC
TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATT
TCCCCGAAAAGTGCCAC

7.4.2 Entry-Vektoren

>pENTR_a2bp1 (5181 bp)



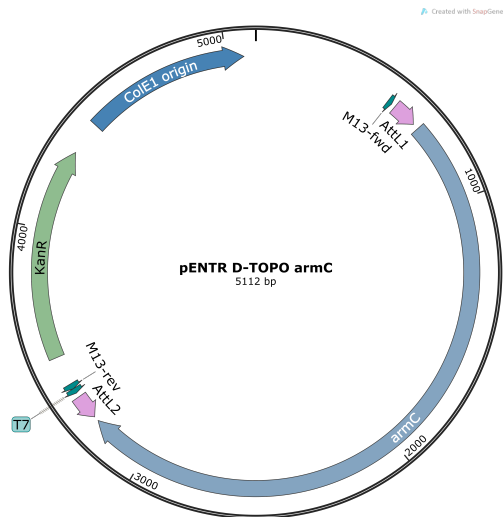
AAATA attL
 ATGAG a2bp1

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAG
 GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCACAACGTTCAAA
 TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCC
 TTCACCATGTATTATCCGCACATGGTGCAGGCGGGCGTAGCGCCTTTTCCGGGCGCTCCGGC
 CGGCTATGCCGCCGCACCGAATCCTGGAGCAGCGGTTGTTGCCGCAGCGGCCGCCGCCAAC
 AACAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAGCAGCAGCAGCAGGCCCAGCAGCAACAGCAA
 CAACAGGTGGCCGGAGGACCACCCAGCGCCGCGGACAGTTTGTCCATGGCGGTGGCAGCGGC
 AGCGGCCAAACAGTCTGCTGATCCAGTGACCCAAATGAAATCGGGCAGCGAGGCCGCAGGAT
 CTGGCAACAGCAATAACAACAACACAGCTGGTGCGGGAACAGGAGCGCCAGGCCGCAGCCGGA
 GGATTGACCACAGAATATTCAAGTGGCGGCTGTGGGGCGGTGGTGCATCAACGGCCAATTC
 GGTGGTGGTGGCCACCAGTGTTCGACGTTGTCAATGCCTCGCTGTACATGCAACAGAAGT
 CCACAGTATTGATCGCCAATGAGGCAGCAGAATCACAACAGAGCTCCGCCATGCAAAATGCC
 GGCGGCGGTGGAAATACTGGCGGCGGCGGCGGCGGAGGAGGCGGCGGCACTCCAGTTCTCC
 GCTCAGCAACTCCCCGTCCAGCGCAACAGCCTCGCAGGCGGGCGGATGCGGACTGACCCTCA
 ATGGCAGCGCCACCGAGGGCAGCATGTCCGGTGATACATCGCCGGTGGCCAGTGGTGAACCG
 CTCCTGCAGACGCCGCCGCCACCAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCCGCTCCTGTGCAG
 CAGTCCCACGTCGATGCAATCGTCGGGCACCTCCGTGACGGGCAGTTCGATAGCTTCCGGCA
 CATTTGGCGGCCACCAGCAGCAGTGGCGTTGGACTTTTGCCACCACCGGATTGGACAGCATT
 GCCAATGGTGGTGCACCAACAGGCTGTGCCGTTGTGCCGGCCAGCACATCGCAGGTGATCGC

CCACCTGAATGCAGCTGCCGCTGCGGCCAGCGGCATCGTGTGCGCCAGCGCCAATGTGGCCA
CTAGTCTCAGCAGCGCCCTAGTCCCAGGCCAATCGGTTGCCGCGGTTGCCGCGCCTCCCTC
GATGCCAAAAGTCAGCCGAAACGGCTGCACGTCTCCAACATACCGTTCCGCTTCCGGGATCC
CGATCTGAGAGCCATGTTTGGGCAATTTGGCACCATTCTGGACGTGAAATCATCTTCAACG
AACGCGGCAGCAAGGGATTTCGGTTTTGTAACATTTCGCTAACAGCAACGATGCAGAACGAGCA
CGCGAACGTCTACACGGCACCGTGGTTGAGGGACGCAAAATCGAGGTGAATAACGCCACTGC
ACGTGTACAAACCAAAAAAGTGACAGCAGTACCCAACGTTTGCCTACAATGGCCAGAAGCCG
CCGTTGCCGCGCAATGCGTGGAGTGGCCATCCAGCGCGGACACGTGGGCGTGGTCCGGCGCC
ACCCCTACCATCATCCCATCATCCGCATCATCATCCGGCGCTGCTGGCGGCCTCCGCGC
CGCTGCCCAACAACAACAGCAACGCCAACTGGCCGCCGCCGCGCTGGCCACGGCAGCAGTCG
CCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCTGTTGTACAGCAGCAACAGCAGCAAGTGGCTGCC
GCCGCCAGCAGCAACACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAGGCCGTGCAGCAACAACA
GGCGGTCCAGCAGCAGCAGCAACATCAACAACAACAGCAGCAGCAGCAACAACAGCAACATG
CCGCCGTAGCAGCCGCCGAGCTGCCGCTTCGCATCCGCACATGCATGCCGCTCATGCCCAT
GCCCATGCCACGCCCTTGGTCCACAATTGGCGCAACTGCAAGCGGTGCCGCTGCCACGGC
CGCTAGCAATGCTGCTGCACTGCAGCAATCCCTCGCCGCTGCCATCCAGAATCCGAGCGGTA
ATCCGAACGCTGCTGCCGCGCCGCCGCTATGCCGCCGCTCTATCGGCGGCCACGGGTGCC
ACACAATCGCCGCAACAGCCGCTGCTGCTGCGGCTGCTGCTTCCATGGCTGCGTCGGCCAA
TGCGGCCAACAATGCGGCCGCTTTGCATGGATTTCGCGCCTGTATACTATGATCCCTTCTTAG
CAGCCGCTGCTTCCGCTGATCCAAATCTACGTTCCAGGCAGCCAAACCGGTCACTGAAGTT
CCAGCCGCTCAGCCAGCCGCCATATTAATCGCCGCACTGTGACTACGCTAAACAGTAACCC
ACATACGATCAACCGCATTCCGGTTCCACAGAATGTTTTGGCCACTGCTCCGCTGCTAAAGA
CTCCGCTGTCTCAGGCCAGCAGCAGGCGTACGCCACGGCGGCCACCACCTACACGGCGGTA
GCCGCCCGGGCCGCTATGGCGCCGCTGCTGCAGCAGCCGCCAGCCGGCACTCGCCGGCTA
CGCCACCGTGGCTGGATATGCGCGCGAATATGCAGATCCTTATCTAGGACATGGCATTGGAC
CAGTTCTGGATACGGGGCTACCATGTACCGCGGTGGATTCAATCGTTTTACGCCATATTA
ATCAAGGGTGGGCGCGCCGACCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTG
CTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTGCCATC
CAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTTCGATTACATGGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGG
CCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAAT
AAAATGCTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGTGTATGAGCCATATTTCAACGGGAAA
CGTCGAGGCCGCGATTAAATTTCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGC
GATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGA
GTTGTTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGAC
TAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTATCCGTACTCCTGAT
GATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATA
TCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCTGA
TTCCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCA
CGAATGAATAACGGTTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGT
TGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACCTC
ATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGAT
GTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGG
TGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATA
TGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGG
TTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATC
CCTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTA
CCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTT
CAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA
AGAATCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCC
AGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
GCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG

AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCG
 GACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG
 AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGG
 TTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

>pENTR_arm (5112 bp)



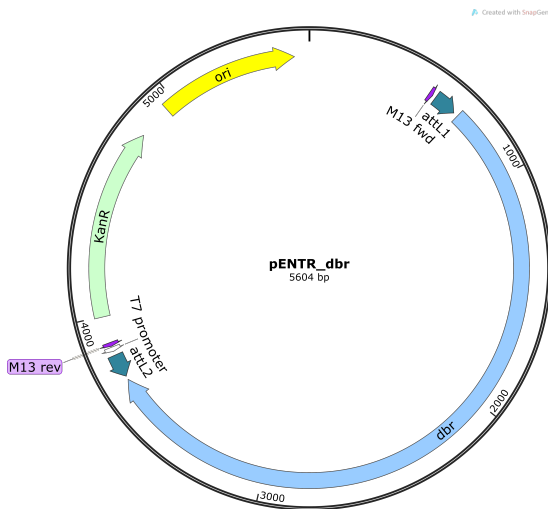
AAATA attL
 ATGAG arm

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAG
 GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTTGCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTACAACGTTCAA
 TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCC
 TTCACCATGAGTTACATGCCAGCCAGAATCGAACCATGTCGCATAATAATCAATACAATCC
 ACCTGATCTGCCGCCGATGGTATCCGCCAAGGAGCAGACCCTCATGTGGCAGCAGAATTCGT
 ACTTGGGCGACTCCGGCATCCACTCGGGTGCCGTGACCCAGGTTCCATCGCTGTCTGGCAAG
 GAGGACGAGGAGATGGAGGGAGATCCACTTATGTTTCGACCTGGACACCGGTTTCCCGCAGAA
 TTTCACACAAGACCAAGTGGACGATATGAACCAGCAACTGAGCCAGACACGCTCCCAACGTG
 TACGTGCTGCCATGTTTTCCGGAAACCCTGGAGGAGGGCATTGAGATTCCCTCCACCCAGTTT
 GATCCCCAACAGCCGACGGCAGTGCAACGTCTTTCGGAACCGTCACAAATGCTAAAGCACGC
 GGTGGTCAATCTGATCAACTACCAGGACGACGCTGAGCTGGCAACCAGGGCCATACCCGAGT
 TGATCAAGCTGCTGAACGATGAGGATCAGGTGGTAGTTTCCCAGGCCGCCATGATGGTCCAC
 CAGCTGTCTAAGAAGGAGGCCTCGCGACATGCCATTATGAACAGCCCTCAGATGGTAGCCGC
 TTTGGTGCGTGCCATCTCTAACAGCAACGATCTGGAGAGCACCAAGGCAGCGGTAGGAACAC
 TGCACAACTTATCACACCATCGCCAGGGTCTGCTGGCCATCTTCAAGAGTGGCGGCATCCCG

GCACTCGTCAAGTTGCTCTCCTCGCCAGTGGAGAGTGTGCTGTTCTATGCAATTACCACTCT
GCACAATTTGCTGCTCCACCAGGATGGCTCTAAGATGGCTGTGCGCCTGGCCGGCGGGCTTC
AGAAGATGGTTACTCTGCTGCAACGAAACAACGTTAAGTTTCTGGCTATCGTCACAGATTGC
TTGCAAATTTCTGGCCTATGGTAACCAGGAGAGCAAGTTAATAATTCTTGCCTCCGGAGGGCC
CAACGAACTCGTGCGCATTATGCGCTCCTACGACTACGAGAAGCTTCTGTGGACCACTTCGC
GGTACTGAAAGTGCTCTCCGTTTGGCTCCAGCAACAAGCCGGCCATCGTGGATGCCGGTGGA
ATGCAGGCGCTGGCTATGCACTTGGGTAACATGTCACCGCGCCTTGTGCAAAACTGTTTGTG
GACGCTCCGCAATCTTTCGGATGCAGCCACTAAGGTGGAGGGCCTTGAAGCTTTGCTCCAAT
CTCTCGTCCAGGTTCTGGGCTCGACCGATGTCAACGTGGTCACCTGTGCCGCCGGTATCCTT
TCAAATCTGACGTGCAACAATCAGCGCAACAAGGCCACCGTTTGTGAGGTGGGCGGTGTGGA
CGCCCTCGTCCGTACTATTATCAATGCTGGAGATCGCGAAGAGATTACCGAGCCGGCTGTAT
GTGCCCTGCGTCACTTGACCTCGCGTCATGTGGACTCTGAGTTGGCCCAGAATGCCGTACGC
TTAAACTACGGACTATCGGTGATTGTAAAGCTATTGCATCCACCATCACGCTGGCCCTTGAT
CAAGGCCGTCATTGGACTCATACGCAATTTGGCCCTCTGTCCGGCCAATCACGCCCCGTTGC
GGGAGCACGGGGCCATCCACCATCTGGTGCGACTGCTTATGCGCGCCTTCCAAGACACAGAG
AGGCAACGTTCCCTCGATAGCCACCCTGGTTCACAGCAGCCGTCCGCATACGCTGACGGCGT
TCGCATGGAGGAGATTGTGAGGGCACGGTGGGGGCGCTACATATCCTGGCCCCGAGTCTC
ACAACCGGGCACTCATTGCCAGCAGTCGGTAATACCGATCTTTGTACGATTGCTGTTCAAC
GAAATCGAGAACATACAGCGCTGGCTGCTGGCGTTCTTTGTGAGCTCGCCGCTGACAAGGA
GGGCGCCGAGATTATCGAGCAGGAGGGCGCCACTGGGCCGCTGACCGATCTCCTGCACTCGC
GCAATGAAGGCGTGGCCACATACGCCGCCGCTGTTCTCTTTTCGCATGAGTGAGGACAAGCCG
CAGGATTACAAGAAGCGGCTATCCATAGAGCTGACCAACTCGCTGCTGCGCGAGGACAACAA
CATATGGGCCAATGCCGACCTGGGCATGGGTCCCGATCTACAGGATATGCTTGGACCAGAAG
AAGCATATGAGGGCCTGTACGGACAAGGTCCGCCAGCGTGCACAGTTCACACGGAGGTTCGC
GCATTCATCAGCAAGGATATGATACTCTACCAATAGATTTCGATGCAGGGTCTGGAGATCAG
CAGCCCAGTGGGCGGCGGCGGTGCTGGCGGTGCTCCCGCAATGGTGGAGCTGTAGGCGGAG
CTAGCGGCGGCGGTGGTAACATCGGCGCCATTCCGCCTAGCGGCGCACCAACTTCGCCCTAT
TCCATGGACATGGACGTTGGCGAGATTGATGCCGGTGCATTGAACTTTGACTTGGACGCCAT
GCCGACGCCACCCAATGACAACAACAACCTGGCTGCCTGGTACGATACCGATTGTTAGAAGG
GTGGGCGCGCCGACC CAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCA
ATTTGTTGCAACGAACAGGTCACCTATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGA
TATCCCCATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCAGCTCTGGCCCCGTGT
CTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTG
TCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAG
GCCGCGATTAAATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATG
TCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTT
CTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTG
GCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCAT
GGTACTCACCACTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGAT
TCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCTGT
TTGTAATTGTCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGA
ATAACGGTTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAA
GTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGA
TTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTGTTGATTGATGTTGGAC
GAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTT
TCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAA
ATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAAC
ACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTAAC
GTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGG
TGGTTTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGA
GCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTC

TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
 ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCG
 GGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
 ATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCAGAGGGAGAAAGGCGGACAGGT
 ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC
 TGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
 CTCGTACAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGG
 CCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

>pENTR_dbr (5604 bp)



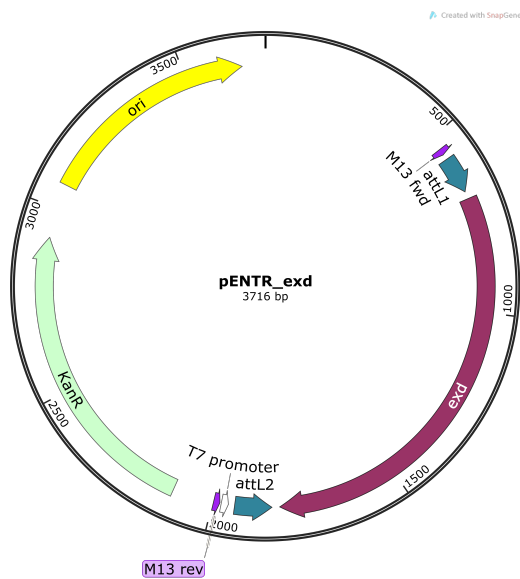
AAATA attL
 ATGAG dbr

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCCTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAG
 GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCAACAGTTCAAA
 TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCC
 TTCACCATGGATGCTCAGTTTGAGCACTTGTGCCGATTTGCGCTGCCAACACGAAAAGCAA
 GACGAATCCGTTGTTGAAAGTGTGTTTTATTTTTAAAACACAGGGACTGAAGGATAAAAATAT
 CTCGACACCTTTATCTAAATGTAGCTGAAGAAGATCCTCTGCCAAAAGTGCTCTGCAAATCT
 TGTTACCGCCAAGTAGAGGCCACGGCGTCGCTTTCAAATATAGCAAAAACATACTCAGCTCGT
 GTTTCGGGACTTTCTCCTTAGTACACTGCCTAAGAATGCGAGGGAAGCGGCTGCTGCACAAC
 TGAGCGTTCAGCAACCCAAATCCCACACCGACACGACGAAGTCCAAGCGGAAATCGATGAA
 TTTCGCCCATTTTGCTGACCCACGTGCCGGAGTCCGGAAACACCGCTTCCAAGCCCCAAC
 AGCCAATTGCCTGGAGCTGGCCCCAAAACCGGCGAAAACCTACTTGGCTGCATCTTCTCAT
 CCTTCTCTGAGCAAACCCGCTGGATCAGTAAAGAGCTATCTTAACACTGGGAGACGCAAC
 AGCGTTTTTACAGACACTAGGTATGGATCGGCCCACTGTCTATCGCTCAACGAACATATGCA
 GTGTCTGCCTTCTTTGGTGCCCCATAAACACAGAGTCATTGGGTAGCAACGCAATGAGAAAGA

GCCCAGACACAAAACCTATCGCCGAAAGGAGTAATAAACTTCATCCAGACTCATGGGCGCATC
ACGGGCAATATACCTGAAGTCCAAGCAGAGGACAATACCGGAAACATCAACGTGACAGATAG
CAGAAACACAGTTACAGCTTCCGTTCTTATTTCTTCAAACGTTAGCAATCCAGGAACGAAAT
CTCAGGACAGTAATTTGTTTCTGCAGAAAAGTAGAAATCTTAAAAACACATTAAACAACATT
AAAGCCATGCGTACCGGACAGGTATCACTGCTTAAGGGTGCGCAAAATCGAAACCCTATTGA
AGATGTTAGACCACTGGTCACAACACTACTGGTACCCCAATATGGTGGTGAACCTTCCGTGG
AGGAAGCACTGCCAGAGCACATGATCTTTGCGGCGCCAAAAAAGAAAAGGGAGGATGAAGAA
CAATTTCTTCAAACGGCTCTGCCACAGCTAAAGAAAACCTGTGCCAAGTCAATCTAAGACAAA
GTCCACAAAACCTCGATTTAACTATATCGGTTGATTTCGCATGTTTCACCCCCGTCAACGTCAA
TTTCTAATGTTAAAAGCCTCACTGATGCAATATTCTGGGAAGCGTTATTAGGGATCCAGAC
TTGTTGATGCTTATTCTCAAGGCTCTAAAATGGCCGGTGACAGCAGAAAACCTGTGATGAGCA
AATGTCCCGCTTAAAAAGTTCAAAGTTCGCTGTTATAATGTCAGACACAAACCTTCTTCAAG
ACACAGATCTCACACAACCTTTTAGGTCCATATTTGGCCCCAATGCTGCCTGTGGTTCAGCAA
CAAGATCAGCATCCACTTTCCCTCAGCTATCGGGTCTGCTTCTTCAAACCATTTCATCGCAGGC
GACTAAAGATGTACTTAAGCTGGCTGACTTATCTAGTGCAATGCCTTATAAACTTCCACCAG
AAACGTTCGGTTCAATTAGTGCTTCCAGTCCCACGGAACAGGAACCGCAGCCTGTGCGTCAC
AAAAAGGCGGTTAGCGTGCCAACTGTCAAACGCCATCAACGAAAGATGCGTGCCCTTGATTT
ACCTGCTGTTGACAAGACGCGCCGCATAATTTGCTTATCGACTTCAAAGGCAGCTTATGTCA
GCAACGAACTGTGCAATATCAATTCTGTGCTTTTTTTCGCAGTTCGAATCAAATCCGGCCGAC
GCTATTAATGAAGCGCTTATCTCACTCCTTAAGCAGCAACAACAAGAAACAAAAGACCAGCG
AAAAACTCGTCAGAGTTGTATTGGCTCTGACAGTGCAGTTAATTTAGAAGACATTGTACTGA
TCGATCCCCAACCGCCTCTTGACAGTCGATCCGCATAATGTGAAGTACCTTGAGGATGACTAC
GTCTCTCCGCAGTCCCAGCCGGATCCCAATACAATTTTAAAAGGCGCAAAACAGACATTTCG
GTCATCAGAGCCGTCTGAAGTCGTTGTGCTCGATAACAGCGGATCCCCAAATGAAAAGAATT
CAAAGAAGTATTTCCAAGTACGAAACAGACTTTATCCAGAGAAACAAAGAAAAGTGCGGTA
ACTGTTAGAAAAGAATCTTTGGGTGAGCTAAAGCAGGCACCCACAAGTACCGTCCCGGAAGA
CATTTGCGATCCTAAAGCCAGAGCCATTAATGCGAAAGAAAATCCCGAAGTGTGTGAACCAG
TCCCGGACAATGGAGGTAGTGACGATATTGATGATAGCAAAGCAGGCTCGGTATCCGTTCCG
AAGTCGGAAGTCAAAGCTGCGCTTGACAAAAGCTTTTGGAGGCTATTGGACTTTCTCAGTT
GGGAGCCGATGCAGCGCCTGAAAACCTCCCGGACACTCTTAGAAGTGCCTTAAAGCGCTCTA
TAAAACAGGCCCCAGGAGCAACAGCTTCAGCTGAAGCGAGGCAATCATGAAGAACCTGTGAAG
CAACTTGCCGATTCACACAACCAAGCTAAGTGCAGCAGAATCGGCAGATGAGCATAAAAAAGC
AATTGCCGAGCGGGAGCTGGCCCTGCTGAATCGTGGATTTAAAGCAGGAGAAGAAAACACGA
TTTCCCTAAAAGATGATAAGTGGGAGCGAACTGATGTTAGTTCTTCATCATCAAGAAACCGC
CGAGGACGTAAATCAAAGATTGATTCCAACGTGAGGATTTTGGCGATGAAGAAAAAAAAGA
CTCTAGATGGGATGAAGACGATGACTTGCCGTTAAAGGCAGATACGGAAAAACCTTCAGAAC
GGAACAGCACCAACGCCCGACCGACCCGTA TAGCAAAACGTTATCAAAGTATTATAAAGGA
CCAACCTTCTAAATCACATCATAGCATGGGTACGCGCTCGACACGACAGCGCTGAAAGGGTGG
GCGCGCCGACCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTT
GTTGCAACGAACAGGTCACCTATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATC
CCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCA
AAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTG
CTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCG
CGATTAATTTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCCG
GCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGA
AACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTG
ACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTATTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTT
ACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAG
GTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCTGTTTGT
AATTGTCCTTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCTGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAA
CGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCT
GGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCAGATTTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTT

TCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGT
 CGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTC
 CTTCAATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTG
 CAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTG
 GCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGA
 GTTACGCGTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
 CCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
 TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC
 AGATAACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
 GCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
 GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCT
 GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
 CTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
 GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT
 ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG
 TCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
 TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

>pENTR_exd (3716 bp)

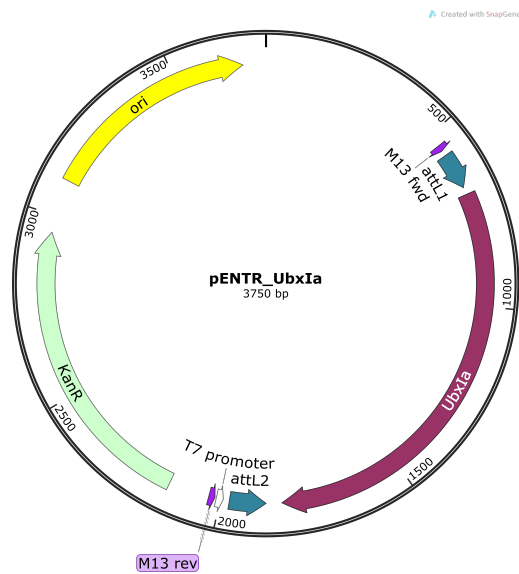


AAATA attL
 ATGAG exd

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAG
 GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTTGCCTGCCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCAACAGTTCAAA
 TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG

ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCC
TTCACCATGGAGGACCCCAATCGCATGTTGGCCACACCGGCGGCATGATGGCTCCGCAAGG
ATACGGCTTGTCTGGCCAGGATGATGGCCAGAATGCCGGCAGCGAGAACGAGGTGCGCAAGC
AGAAGGACATCGGCGAGATATTGCAACAGATAATGAGTATCTCGGAGCAATCACTTGACGAG
GCCCAGGCCAGAAAACATACTAACTGTACCCGAATGAAGCCGGCACTTTTCTCTGTACT
TTGCGAAATCAAGGAGAAGACCGTCTCTCGATTGCAACACCCAGGAGGAGGCCCCAG
ATCCGCAACTGATGCGCTTGGACAACATGCTGATTGCCGAGGGCGTGGCCGGACCCGAGAAG
GGCGGTGGCGGAGCAGCGGCTGCCTCTGCGGCTGCGGCCAGCCAGGGCGGTTCCCTGTCCAT
CGATGGTGTGACAATGCCATTGAGCATTCCGACTACCGTGCCAAGCTGGCACAGATCCGTC
AAATATATCACCAGGAATTGGAGAAGTACGAGCAGGCATGCAACGAGTTCACCACGCATGTC
ATGAATCTTCTACGCGAACAGAGTTCGCACGAGACCCATTACACCAAAGGAAATCGAGCGAAT
GGTGCAGATCATCCACAAAAGTTTAGTTCCATACAAATGCAGCTGAAGCAGTCGACCTGCG
AGGCTGTAATGATACTTCGTTTCGCGTTTCCCTGGACGCACGCCGCAAACGCCGCAATTTGAG
AAGCAGGCATCCGAGATTCTCAACGAGTACTTCTACAGTCACTTGAGCAACCCATATCCATC
CGAAGAGGCCAAAGAGGAGTTGGCACGAAAGTGTGGCATCACGGTCTCGCAAGTATCGAATT
GGTTTGGCAACAAGCGTATTCGCTATAAGAAGAACATTGGTAAGGCACAGGAGGAGGCCAAT
TTGTATGCGGCCAAGAAGGCGGCTGGTGTTCACCGTATTCCATGGCCGGTCCACCCAGCGG
GACAACCACACCCATGATGTCACCCGCTCCGCCACAGGATTCCATGGGCTATCCAATGGGCT
CCGGCGGATACGACCAGCAGCAACCGTACGACAACAGCATGGGCGGCTACGACCCAAATCTC
CATCAGGATCTAAGCCCCTGAGGATCAAGGGTGGGCGCGCCGACCAGCTTTCTTGTACAAA
GTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCA
AAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCTATAGTGAGTTCGTATTACATGGTCA
TAGCTGTTTCCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGAT
AAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGT
TATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATGCTGATT
TATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTG
TATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGA
TGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCA
AGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACA
GCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGT
GTTCCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTAT
TTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGAT
GACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATT
CTCACCAGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGG
GGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTT
GCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCACTACAGAAACGGCTTTTTCAAAA
ATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTT
TCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGAC
GGCGCAAGCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGA
CCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
TGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACT
CTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTCCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAA
TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGA
CGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAG
CTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCA
CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCA
CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG
CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

>pENTR_UbxIa (3750 bp)

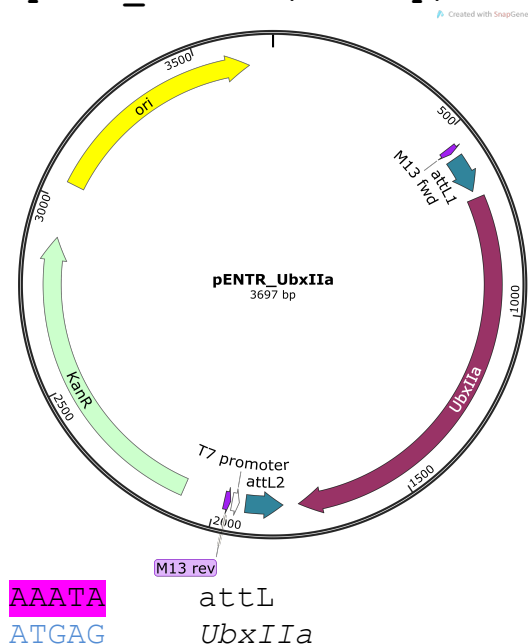


AAATA attL
 ATGAG UbxIa

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAG
 GTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTACAACGTTCAA
 TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTACCGACAAACAACAGATAAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGGCCGCC
 TTCACCATGAACCTCGTACTTTGAACAGGCCTCCGGCTTTTTATGGCCATCCGCACCAGGCCAC
 CGGAATGGCAATGGGCAGCGGTGGCCACCACGACCAGACGGCCAGTGCAGCGGCGGCCGCGT
 ACAGAGGATTCCCTCTCTCGCTGGGCATGAGTCCCTATGCCAACACCACATCTGCAGCGCACC
 ACCCAGGACTCGCCCTACGATGCCAGCATCACGGCCGCCTGCAACAAGATATACGGCGATGG
 AGCCGGAGCCTACAAACAGGACTGCCTGAACATCAAGGCGGATGCGGTGAATGGCTACAAAG
 ACATTTGGAACACGGGCGGCTCGAATGGCGGGCGGGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGTGGCGGC
 GGAGCGGGCGGAACAGGTGGAGCCGGCAATGCCAATGGCGGTAATGCGGCCAATGCAAACGG
 ACAGAACAAATCCGGCGGGCGGTATGCCCGTTAGACCCTCCGCCTGCACCCAGATTCCCGAG
 TGGGCGGCTATTTGGACACGTCGGGCGGCAGTCCCGTTAGCCATCGCGGCGGCAGTGCCGGC
 GGTAATGTGAGTGTGAGCGGCGCAACGGCAACGCCGAGGCGTACAGAGCGGCGTGGGCGT
 GGCCGGAGCGGGCACTGCCTGGAATGCCAATTGCACCATCTCGGGCGCCGCTGCCCAAACGG
 CGGCCGCCAGCAGTTTACACCAGGCCAGCAATCACACATTCTACCCCTGGATGGCTATCGCA
 GGTAAGATAAGATCTGATTTAACACAATACGGCGGCATATCAACAGACATGGGTAAGAGATA
 CTCAGAATCTCTTGGCGGCTCACTTCTACCAGACTGGCTAGGTACAAATGGTCTGCGAAGAC
 GCGGCCGACAGACATACCCCGCTACCAGACGCTCGAGCTGGAGAAGGAGTTCCACACGAAT
 CATTATCTGACCCGCAGACGGAGAATCGAGATGGCGCACGCGCTATGCCTGACGGAGCGGCA
 GATCAAGATCTGGTTCAGAACGGCGAATGAAGCTGAAGAAGGAGATCCAGGCGATCAAGG
 AGCTGAACGAACAGGAGAAGCAGGCGCAGGCCAGAAGGCGGCGGCGGCAGCGGCTGCGGCG
 GCGGCGGTCCAAGGTGGACACTTAGATCAGTAGATCCTTAGATCCTTAGATCCTTAGATCAA

GGGTGGGCGCGCCGACC CAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTAT
 CAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAAATAAAATCATTATTT GCCATCCAGCT
 GATATCCCCTATAGTGAGTTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGGCCCGT
 GTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAAC
 TGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCG
 AGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAA
 TGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGT
 TTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAAC
 TGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGC
 ATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTG
 ATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGTTGCATTTCGATTCCT
 GTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAAT
 GAATAACGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGGTACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAAC
 AAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACATCATGGT
 GATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGG
 ACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGT
 TTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTCAAATAATGGTATTGATAATCCTGATATGAAT
 AAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTA
 ACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAATCCCTTA
 ACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
 TGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCAGCTACCAGC
 GGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCA
 GAGCGCAGATAACAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAAC
 TCTGTAGCACCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
 CGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
 CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
 AGATACTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG
 GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
 CCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGA
 TGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCT
 GGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGTT

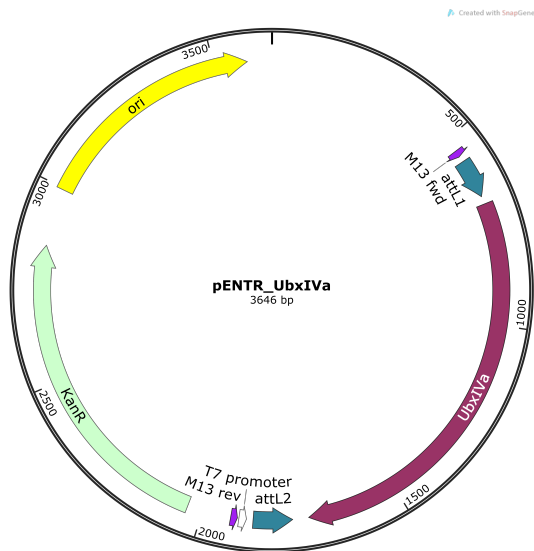
>pENTR_UbxIIa (3697 bp)



CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAG
GTTTCCCAGCTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCGCCACCCCTCCGGGCCGTTGCTTCAACAGTTCAAA
TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTACCGACAAACAACAGATAAAAACG
AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTC
GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCC
TTCACCATGAACTCGTACTTTGAACAGGCCTCCGGCTTTTATGGCCATCCGCACCAGGCCAC
CGGAATGGCGATGGGCAGCGGTGGCCACCACGACCAGACGGCCAGTGCAGCGGCGGCCGCGT
ACAGGGGATTCCCTCTCTCGCTGGGCATGAGTCCCTATGCCAACCCACCATCTGCAGCGCACC
ACCCAGGACTCGCCCTACGATGCCAGCATCACGGCCGCCTGCAATAAGATATACGGCGATGG
AGCCGGAGCCTACAAACAGGACTGCCTGAACATCAAGGCGGATGCGGTGAATGGCTACAAAG
ACATTTGGAACACGGGCGGCTCGAATGGCGGGGGGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGTGGCGGC
GGAGCGGGCGGAACAGGTGGAGCCGGCAATGCCAATGGCGGTAATGCGGCCAATGCAAACGG
ACAGAACAATCCGGCGGGCGGTATGCCCGTTAGACCCTCCGCCTGCACCCAGATTCCCGAG
TGGGCGGCTACTTGGACACGTCGGGCGGCAGTCCCGTTAGCCATCGCGGCGGCAGTGCCGGC
GGTAATGTGAGTGTGAGCGGCGGCAACGGCAACGCCGGAGGCGTACAGAGCGGCGTGGGCGT
GGCCGGAGCGGGCACTGCCTGGAATGCCAATTGCACCATCTCGGGCGCCGCTGCCCAAACGG
CGGCCGCCAGCAGTTTACACCAGGCCAGCAATCACACATTCTACCCCTGGATGGCTATCGCA
GGTAAGAGATACTCAGAATCTCTTGCGGGCTCACTTCTACCAGACTGGCTAGGTACAAATGG
TCTGCGAAGACGCGGCCGACAGACATACCCCGCTACCAGACGCTCGAGCTGGAGAAGGAGT
TCCACACGAATCATTATCTGACCCGCAGACGGAGAATCGAGATGGCGCACGCGCTATGCCTG
ACGGAGCGGCAGATCAAGATCTGGTTCCAGAACC GGCGAATGAAGCTGAAGAAGGAGATCCA
GGCGATCAAGGAGCTGAACGAACAGGAGAAGCAGGCGCAGGCCCAGAAGGCGGCGGCAG
CGGCTGCGGCGGCGGGCGGTCCAAGGTGGACACTTAGATCAGTAGCCTTAGATCCTTAGATCC
TTAGATCAAGGGTGGGCGCGCCGACCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGC
ATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAAATAAAATCATTATTTGC
CATCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCCCTGGCAGCT
CTGGCCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAA
CAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTC AACGG
GAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGC
TCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGC
CAGAGTTGTTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTC
AGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATT TTTATCCGTACTCC
TGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCCCGGA AAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAG
AATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCAT
TCGATTCCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTT AACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCTCGCTCAGGCGCA
ATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTT GATGACGAGCGTAATGGCTGGC
CTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTT GCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTC
ACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTT GACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTAT
TGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGA ACTGCC
TCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTT CAAAATATGGTATTGATAATCCT
GATATGAATAAATGCAAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAA
TTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAA
AATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAA
GGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCACC
GCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTG

GCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC
 TTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
 TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAG
 CGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
 ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
 GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
 GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGA
 TTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTT
 ACGTTTCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTT

>pENTR_UbxIVa (3646 bp)



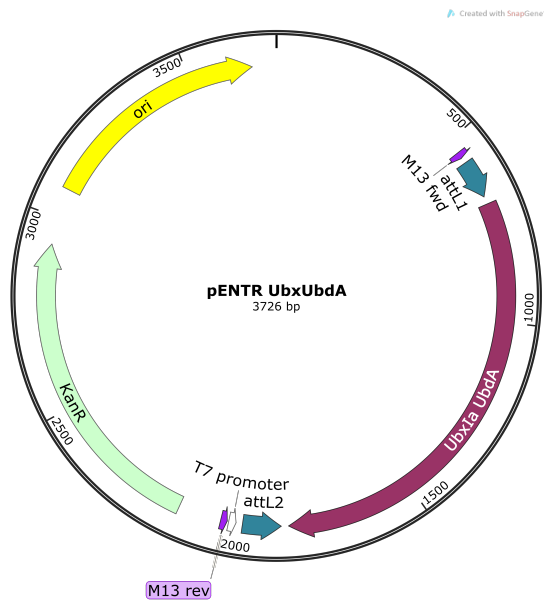
AAATA attL
 ATGAG UbxIVa

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAG
 GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCAACAGTTCAA
 TCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTACCGACAAACAACAGATAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCC
 TTCACCATGAACTCGTACTTTGAACAGGCCTCCGGCTTTTTATGGCCATCCGCACCAGGCCAC
 CGGAATGGCGATGGGCAGCGGTGGCCACCACGACCAGACGGCCAGTGCAGCGGCGGCCGCGT
 ACAGGGGATTCCCTCTCTCGCTGGGCATGAGTCCCTATGCCAACACCATCTGCAGCGCACC
 ACCCAGGACTCGCCCTACGATGCCAGCATCACGGCCGCCTGCAATAAGATATACGGCGATGG
 AGCCGGAGCCTACAAACAGGACTGCCTGAACATCAAGGCGGATGCGGTGAATGGCTACAAAG
 ACATTTGGAACACGGGCGGCTCGAATGGCGGGGGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGTGGCGGC
 GGAGCGGGCGGAACAGGTGGAGCCGGCAATGCCAATGGCGGTAATGCGGCCAATGCAAACGG

ACAGAACAATCCGGCGGGCGGTATGCCCGTTAGACCCTCCGCCTGCACCCCAGATTCCCGAG
TGGGCGGCTACTTGGACACGTCGGGCGGCAGTCCCCTTAGCCATCGCGGCGGCAGTGCCGGC
GGTAATGTGAGTGTGAGCGGGCGGCAACGGCAACGCCGGAGGCGTACAGAGCGGCGTGGGCGT
GGCCGGAGCGGGCACTGCCTGGAATGCCAATTGCACCATCTCGGGCGCCGCTGCCCAAACGG
CGGCCGCCAGCAGTTTACACCAGGCCAGCAATCACACATTCTACCCCTGGATGGCTATCGCA
GGTACAAATGGTCTGCGAAGACGCGGCCGACAGACATACACCCGCTACCAGACGCTCGAGCT
GGAGAAGGAGTTCCACACGAATCATTATCTGACCCGCAGACGGAGAATCGAGATGGCGCACG
CGCTATGCCTGACGGAGCGGCAGATCAAGATCTGGTTCCAGAACC GGCGAATGAAGCTGAAG
AAGGAGATCCAGGCGATCAAGGAGCTGAACGAACAGGAGAAGCAGGCGCAGGCCCAGAAGGC
GGCGGCGGCAGCGGCTGCGGCGGCGGCGGTCCAAGGTGGACACTTAGATCAGTAGCCTTAGA
TCCTTAGATCCTTAGATCAAGGGTGGGCGCGCCGACC CAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCAT
TATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAAATAAAA
TCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTT
TCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATAT
ATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCC
ATATTTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGG
TATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAA
GCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAG
ATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATT
ATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCA
GGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGC
GCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTC
GCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCG
TAATGGCTGGCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGG
ATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTA
ATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCT
ATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTA
TTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCA
GAATTTGGTTAATTTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAG
CTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC
GAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGT
CCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTT
ACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAG
GGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGAC
TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTGCTCACATGTT

>pENTR_UbxIa UbdA (3726 bp)

Die *Ubx^{UbdA}* cDNA stammte von Dr. Samir Merabet (IGFL, Frankreich).



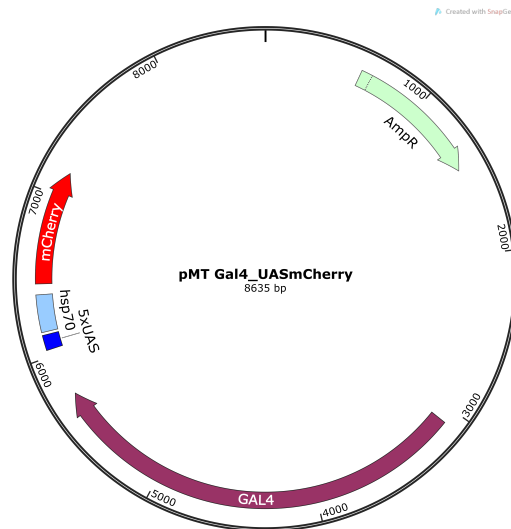
AAATA attL
 ATGAG Ubx UbdA

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAG
 GTTTCCTCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGG
 AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCC
 TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCCCTGCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCACAACGTTCAAA
 TCCGCTCCCGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACG
 AAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTC
 GCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAA
 GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG
 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCC
 TTCACCATGAACTCGTACTTTGAACAGGCCTCCGGCTTTTATGGCCATCCGCACCAGGCCAC
 CGGAATGGCGATGGGCAGCGGTGGCCACCACGACCAGACGGCCAGTGCAGCGGCGGCCGCGT
 ACAGGGGATTCCCTCTCTCGCTGGGCATGAGTCCCTATGCCAACACCACATCTGCAGCGCACC
 ACCAGGACTCGCCCTACGATGCCAGCATCACGGCCGCCTGCAACAAGATATACGGCGATGG
 AGCCGGAGCCTACAAACAGGACTGCCTGAACATCAAGGCGGATGCGGTGAATGGCTACAAAG
 ACATTTGGAACACGGGCGGCTCGAATGGCGGCGGGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGTGGCGGC
 GGAGCGGGCGGAACAGGTGGAGCCGGCAATGCCAATGGCGGTAATGCGGCCAATGCAAACGG
 ACAGAACAAATCCGGCGGGCGGTATGCCCGTTAGACCTCCGCCTGCACCCAGATTTCCCGAG
 TGGGCGGCTACTTGGACACGTCGGGCGGCAGTCCCGTTAGCCATCGCGGCGGCAGTGCCGGC
 GGTAATGTGAGTGTGAGCGGCGGCAACGGCAACGCCGGAGGCGTACAGAGCGGCGTGGGCGT
 GGCCGGAGCGGGCACTGCCTGGAATGCCAATTGCACCATCTCGGGCGCCGCTGCCCAAACGG
 CGGCCGCCAGCAGTTTACACCAGGCCAGCAATCACACATTCTACCCCTGGATGGCTATCGCA
 GGTAAGATAAGATCTGATTTAACACAATACGGCGGCATATCAACAGACATGGGTAAGAGATA

CTCAGAATCTCTTGCGGGCTCACTTCTACCAGACTGGCTAGGTACAAATGGTCTGCGAAGAC
GCGGCCGACAGACATACACCCGCTACCAGACGCTCGAGCTGGAGAAGGAGTTCCACACGAAT
CATTATCTGACCCGCAGACGGAGAATCGAGATGGCGCACGCGCTATGCCTGACGGAGCGGCA
GATCAAGATCTGGTTCCAGAACC GGCGAATGAAGCTGAAGAAGGAGATCCAGGCGATCGTGG
TGCTGATCGTAGCGGAGAAGCAGGCGCAGGCCAGAAAGGCGGCGGGCAGCGGCTGCGGCG
GCGGCGGTCCAAGGTGGACACTTAGATCAGTAGATCCTTAGATCCTTAGATCCTTAGATCAA
GGGTGGGCGCGCCGACC CAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTAT
CAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACCTATCAGTCAAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCT
GATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGGCCCGT
GTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAAC
TGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTTCAACGGGAAACGTCG
AGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAA
TGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGT
TTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAAC
TGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGC
ATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTG
ATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGTTGCATTTCGATTCCT
GTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAAT
GAATAACGGTTTTGTTGATGCGAGTGATTTTGTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAAC
AAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGT
GATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGG
ACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGT
TTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAATAATGGTATTGATAATCCTGATATGAAT
AAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTA
ACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTA
ACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
TGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGC
GGTGGTTTGTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCA
GAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAC
TCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTGCTTACC GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
AGATACTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG
GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGA
TGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTT
GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

7.4.3 pMT Gal4_UASmCherry

Der pMT Gal4 (Klueg et al., 2002) ist erhältlich über das *Drosophila Genomics Resource Center* (DGRC, Indiana University, Bloomington, USA) und wurde für diese Arbeit durch Einbringung einer UAS-*mCherry* Kasette modifiziert.



ATGAA	Gal4
ATGGT	mCherry
CGGAG	5X UAS
CGCCG	HSP70 Promotor

```

GGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATC
GCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC
CCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC
GCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCG
CATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTG
CTCCCGGCATCCGTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTT
TTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGG
TTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGC
GGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA
ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG
TCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTG
GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTT
TTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCCTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAA
CGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTG
GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGC
CGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
    
```

TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT
TTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATA
ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
AGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
GGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTAC
CGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGA
ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTAT
CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGC
CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGAAACC
GCCTCTCCCCGCGCTTGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA
AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCT
TTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC
AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCGTTGCAGGACAGGATGTGGTGCCCGATGTGACTAG
CTCTTTGCTGCAGGCCGTCTATCCTCTGGTTCCGATAAGAGACCCAGAACTCCGGCCCCC
ACCGCCCACCGCCACCCCATACATATGTGGTACGCAAGTAAGAGTGCCTGCGCATGCCCA
TGTGCCCCACCAAGAGTTTTGCATCCCATAACAAGTCCCCAAAGTGGAGAACCGAACCAATTC
TTCGCGGGCAGAACAAAAGCTTCTGCACACGTCTCCACTCGAATTTGGAGCCGGCCGGCGTG
TGCAAAAGAGGTGAATCGAACGAAAGACCCGTGTGTAAAGCCGCTTTCCAAAATGTATAAA
ACCGAGAGCATCTGGCCAATGTGCATCAGTTGTGGTCAGCAGCAAAATCAAGTGAATCATCT
CAGTGCAACTAAAGGGAATTCGATATCAAGCTTCAAGCCTCCTGAAAGATGAAGCTACTGTC
TTCTATCGAACCAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAAAC
CGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCTACTCTCCCAAACCAAAGG
TCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCT
ATTTCTACTGATTTTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGG
ATATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTCACA
GATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGC
GACATCATCATCGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGATTGACT
CGGCAGCTCATCATGATAACTCCACAATTCCGTTGGATTTTATGCCAGGGATGCTCTTCAT
GGATTTGATTGGTCTGAAGAGGATGACATGTCGGATGGCTTGCCCTTCCTGAAAACGGACCC
CAACAATAATGGGTTCTTTGGCGACGGTTCTCTCTTATGTATTCTTCGATCTATTGGCTTTA
AACCGGAAAATTACACGAACTCTAACGTTAACAGGCTCCCGACCATGATTACGGATAGATAC
ACGTTGGCTTCTAGATCCACAACATCCCGTTTACTTCAAAGTTATCTCAATAATTTTACCC
CTACTGCCCTATCGTGCACCTACCGACGCTAATGATGTTGTATAATAACCAGATTGAAATCG
CGTCGAAGGATCAATGGCAAATCCTTTTTAACTGCATATTAGCCATTGGAGCCTGGTGTATA
GAGGGGAATCTACTGATATAGATGTTTTTTACTATCAAAATGCTAAATCTCATTGACGAG
CAAGGTCTTCGAGTCAGGTTCCATAATTTGGTGACAGCCCTACATCTTCTGTGCGGATATA
CACAGTGGAGGCAGAAAACAAATACTAGCTATAATTTTACAGCTTTTCCATAAGAATGGCC
ATATCATTGGGCTTGAATAGGGACCTCCCTCGTCCTTCAGTGATAGCAGCATTCTGGAACA
AAGACGCCGAATTTGGTGGTCTGTCTACTCTTGGGAGATCCAATTGTCCCTGCTTTATGGTC
GATCCATCCAGCTTTCTCAGAATACAATCTCCTTCCCTTCTTCTGTCGACGATGTGCAGCGT
ACCACAACAGGTCCCACCATATATCATGGCATCATTGAAACAGCAAGGCTCTTACAAGTTTT
CACAAAATCTATGAACTAGACAAAACAGTAACTGCAGAAAAAGTCCTATATGTGCAAAAA
AATGCTTGATGATTTGTAATGAGATTGAGGAGGTTTCGAGACAGGCACCAAAGTTTTTACAA
ATGGATATTTCCACCACCGCTCTAACCAATTTGTTGAAGGAACACCCTGGCTATCCTTAC

AAGATTTCGAACTGAAGTGGAAACAGTTGTCTCTTATCATTATGTATTAAGAGATTTTTTCA
CTAATTTTACCCAGAAAAAGTCACAAC TAGAACAGGATCAAAATGATCATCAAAGTTATGAA
GTTAAACGATGCTCCATCATGTTAAGCGATGCAGCACAAAGA ACTGTTATGTCTGTAAGTAG
CTATATGGACAATCATAATGTCACCCCATATTTTGCCTGGAATTGTTCTTATTACTTGTTCA
ATGCAGTCTAGTACCCATAAAGACTCTACTCTCAA ACTCAAATCGAATGCTGAGAATAAC
GAGACCGCACAAATTATTACAACAAATTAACACTGTTCTGATGCTATTA AAAAAACTGGCCAC
TTTTAAAATCCGACTTGTGAAAAATACATTC AAGTACTGGAAGAGGTATGTGCGCCGTTTC
TGTTATCACAGTGTGCAATCCCATTACCGCATATCAGTTATAACAATAGTAATGGTAGCGCC
ATTA AAAATATTGTTCGGTTCTGCAACTATCGCCCAATACCCTACTCTTCCGGAGGAAAATGT
CAACAATATCAGTGTTAAATATGTTTCTCCTGGCTCAGTAGGGCCTTCACCTGTGCCATTGA
AATCAGGAGCAAGTTTCAGTGATCTAGTCAAGCTGTTATCTAACCGTCCACCCTCTCGTAAC
TCTCCAGTGACAATACCAAGAAGCACACCTTCGCATCGCTCAGTCACGCCTTTTCTAGGGCA
ACAGCAACAGCTGCAATCATTAGTGCCACTGACCCCGTCTGCTTTGTTTGGTGGCGCCAATT
TTAATCAAAGTGGGAATATTGCTGATAGCTCATTGTCCTTCACTTTC ACTAACAGTAGCAAC
GGTCCGAACCTCATAACA ACTCAAACAATTTCTCAAGCGCTTTCACAACCAATTGCCTCCTC
TAACGTTTATGATAACTTCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATA
ATTCAAAACCACTGTCACCTGGTTGGACGGACCAA ACTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACT
ACAGGGATGTTTAAATACCACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATT CGATGATGAAGA
TACCCACCAAACCCAAAAAAGAGTAA AATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTT
CACTTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTTATACATCGTTTTGCCTTCT
TTTATGTA ACTATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATT
TTTTAAATGACTAGAAATTAATGCCCATCTTTTTTTTTGGACCTAAAATTCTTCATGAAAATATA
TTACGAGGGCTTATTCAGAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCG
GGGATCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGT CGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCTCC
GAGCGGAGTACTGTCTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCTCCGAGCG
GAGACTCTAGCGAG CGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAAT
TCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAACAAGCGCAGCTGA
ACAAGCTAAACAATCTGCAGTAAAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTA AAAGTAACCAGCAA
CCAAGTAAATCAACTGCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAA GAAGAG
AACTCTGAATAGGGAATTGGGAATTCGTTAACAGATCTGCGGCCGCGGCTCGAGGGTACC AT
GGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGC
ACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCC
TACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTG
GGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACA
TCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTC
GAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTA
CAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCA
TGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATC
AAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCT
CCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACC
GGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA TCTAGAGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGT
GGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATT
TTTAAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCT
ATGGA ACTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCA
GAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAA
AAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTC
ATGCTGTGTTTAGTAATAGA ACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCT
GCACTGCTATAACAAGAAAATTATGGAAAAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCA
TAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGTTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCC
CTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA
TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATT

CTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCTCTAGAGTCGA
CCTGCAGGCATGCAAGCTATTCGATGCACACTCACATTCTTCTCCTAATACGATAATAAAAC
TTTCCATGAAAAATATGGAAAAATATATGAAAATTGAGAAATCCAAAAAACTGATAAACGCT
CTACTTAATTAAAATAGATAAATGGGAGCGGCAGGAATGGCGGAGCATGGCCAAGTTCCTCC
GCCAATCAGTCGTAAAACAGAAGTCGTGGAAAGCGGATAGAAAGAATGTTTCGATTTGACGGG
CAAGCATGTCTGCTATGTGGCGGATTGCGGAGGAATTGCACTGGAGACCAGCAAGGTTCTCA
TGACCAAGAATATAGCGGTGAGTGAGCGGGAAGCTCGGTTTCTGTCCAGATCGAACTCAAAA
CTAGTCCAGCCAGTCGCTGTCGAACTAATTAAGTAAATGAGTTTTTCATGTTAGTTTTCGCG
CTGAGCAACAATTAAGTTTTATGTTTCAGTTCGGCTTAGATTTTCGCTGAAGGACTTGCCACTT
TCAATCAATACTTTAGAACAAAATCAAACTCATTCTAATAGCTTGGTGTTCATCTTTTTTT
TTAATGATAAGCATTTTGTCGTTTATACTTTTTTATATTTTCGATATTAAACCACCTATGAAGT
TCATTTTAATCGCCAGATAAGCAATATATTGTGTAAATATTTGTATTCTTTATCAGGAAATT
CAGGGAGACGGGGAAGTTACTATCTACTAAAAGCCAAACAATTTCTTACAGTTTTACTCTCT
CTACTCTAGAGTAGCTT

7.5 Curriculum Vitae

Name:	Christian Hessinger, Diplom Biologe
Geburtsdatum und Ort:	22. November 1985 in Mainz
Anschrift:	Kästrich 39, 55116 Mainz
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Akademische Ausbildung

06/ 2011 - heute	Promotion Institut für Genetik und Zellbiologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz gefördert durch das Neuro-Graduiertenkolleg „Entwicklungsabhängige und krankheitsinduzierte Modifikationen im Nervensystem“ (DFG GRK 1044)
04/ 2011	Diplom in Biologie (Durchschnittsnote 1,1) Diplomarbeit angefertigt am Institut für Genetik und Zellbiologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz gefördert durch die Stipendienstiftung Rheinland-Pfalz
10/ 2005 - 04/ 2011	Studium der Biologie Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Schulische Ausbildung

03/ 2005	Abitur (Durchschnittsnote 1,8) Sebastian-Münster-Gymnasium, Ingelheim am Rhein
08/1996 - 03/2005	Sebastian-Münster-Gymnasium , Ingelheim am Rhein

7.6 Publikationsleistung

Publikationen in Fachzeitschriften

Hessinger, C., Ana-Rogulja-Ortmann and Gerhard M. Technau.“ The *Drosophila Hox* gene *Ultrabithorax* controls correct innervation of ventro-lateral muscles by coordinating Wnt4 ligand expression in muscles with the signalling pathway response in motoneurons“, Manuskript in Bearbeitung.

Geyer, A., Koltsaki, I., **Hessinger, C.**, Renner, S., Rogulja-Ortmann, A., 2015. Impact of Ultrabithorax alternative splicing on *Drosophila* embryonic nervous system development. *Mechanisms of Development (MOD)*. doi: 10.1016/j.mod.2015.08.007.

Vorträge

- 2015 *European Drosophila Research Conference* in Heidelberg
- 2013 Jahresarbeitstreffen des Graduiertenkollegs in Arcachon, Frankreich
- 2012 Jahresarbeitstreffen des Graduiertenkollegs in Obergurgl, Österreich
- 2011 *Development and function of the Drosophila nervous system* in Stockholm, Schweden

Posterpräsentationen

- 2015 *Neurobiology of Drosophila* in Cold Spring Harbor, USA
- 2014 *Neurofly* in Hersonissos, Kreta
Drosophila meeting in Mainz
- 2012 *HOX and TALE Homeoproteins in Development and Disease - European Cooperation of Science and Technology (COST) Workshop* in El Escorial, Spanien
Rhine-Main Neuroscience Network (rmn²) in Oberwesel
Neurofly in Padua, Italien

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Absatz 3d der Promotionsordnung

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe und hatte die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
3. Ich hatte weder die als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

Christian Hessinger

7.8 Danksagung

-Aus Datenschutzgründen entfernt-

-Aus Datenschutzgründen entfernt-