

**Identifikation und Funktion neuer Fibroblasten-
Wachstumsfaktoren in der Mesodermwanderung
von *Drosophila melanogaster***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von
Tanja Gryzik
aus Dorsten

Düsseldorf, 2005

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung:
2. Mai 2005

Berichtersteller: Prof. Dr. E. Knust
PD. Dr. H.-A. J. Müller

1	Einleitung	1
1.1	FGF-vermittelte Zellwanderungsprozesse während der Entwicklung.....	2
1.2	Determination, Invagination und Wanderung des Mesoderms in <i>Drosophila</i>	5
1.3	Regulation der Mesodermwanderung durch den FGF-Signalweg in <i>Drosophila</i> ..	7
1.4	Themenstellung.....	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien und sonstige Materialien.....	11
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	12
2.2.1	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	12
2.2.2	Isolierung von DNA.....	13
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	13
2.2.2.2	Präparation von genomischer DNA aus Fliegen.....	13
2.2.2.3	DNA-Extraktion aus Embryonen mittels Chelex.....	14
2.2.2.4	DNA-Extraktion aus einzelnen Fliegen.....	15
2.2.3	Isolierung von polyA ⁺ -RNA.....	15
2.2.4	Northern-blot	15
2.2.5	PCR	17
2.2.5.1	Standard-PCR	18
2.2.5.2	RT-PCR	19
2.2.5.3	3'-RACE.....	20
2.2.6	Herstellung der verwendeten Plasmid-Konstrukte	20
2.2.6.1	Die cDNA von <i>FGF8-like1</i>	20
2.2.6.2	Die cDNA von <i>FGF8-like2</i>	20
2.2.6.3	Das pUAS- <i>FGF8-like1</i> -Effektorkonstrukt.....	21
2.3	Mikromanipulation von <i>Drosophila melanogaster</i>	21
2.3.1	Keimbahntransformation.....	21
2.3.1.1	Herstellung der Injektionslösung und der Injektionskapillaren	21
2.3.1.2	Mikroinjektion	22
2.3.1.3	Isolierung und Balancierung transgener Fliegen	23
2.3.2	RNA-Interferenz	23
2.3.2.1	Herstellung der dsRNA mittels PCR.....	24
2.3.2.2	Mikroinjektion	24
2.3.2.3	Antikörperfärbung an injizierten Embryonen.....	24
2.4	Genetische Methoden.....	25
2.4.1	Fliegenzucht.....	25
2.4.2	Fliegenstämme, Chromosomen und Allele	25
2.4.2.1	Balancer-Chromosomen	25
2.4.2.2	Mutante Fliegenstämme	26
2.4.3	Das GAL4/UAS-System	27
2.4.4	Erzeugung von synthetischen Deletionen	28
2.4.5	FRT-vermittelte Rekombination.....	28
2.4.6	Ungenaue P-Element-Exzision.....	31
2.5	Histologische Methoden.....	32
2.5.1	Verwendete Antikörper	32
2.5.2	Antikörperfärbungen an Embryonen.....	32
2.5.2.1	Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper	32
2.5.2.2	Nachweis mit Enzym-gekoppelten Antikörpern.....	33
2.5.3	Querschnitte von gefärbten Embryonen.....	34
2.5.3.1	Einbettung in Technovit	34

2.5.3.2	Einbettung in Araldit.....	35
2.5.4	in situ-Hybridisierung an Embryonen.....	36
2.6	Proteinbiochemische Methoden	37
2.6.1	Erzeugung von FGF8-like1- und FGF8-like2-spezifischen Antikörpern	37
2.6.2	Herstellung von Embryonenextrakten.....	37
2.6.3	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blot.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Identifizierung neuer zygotischer Gene mittels synthetischer Defizienzen	39
3.2	Kartierung der genomischen Bereiche.....	44
3.2.1	Deletionskartierung	44
3.2.2	Erzeugung neuer Deletionen durch Röntgenbestrahlung und „male recombination“.....	46
3.2.3	Erzeugung neuer Deletionen durch FRT-vermittelte Rekombination	46
3.2.3.1	Deletionen in der <i>prd</i> -Region	47
3.2.3.2	Deletionen in der <i>en</i> -Region	49
3.3	Identifizierung der verantwortlichen Gene in der <i>en</i>-Region.....	52
3.3.1	Expressionsprofile und Homologien von <i>CG12443</i> und <i>CG13194</i>	52
3.3.2	Die vollständigen cDNAs von <i>CG12443</i> und <i>CG13194</i> kodieren für zwei neue FGFs	54
3.3.3	<i>FGF8-like1</i> und <i>FGF8-like2</i> werden während der Gastrulation exprimiert	56
3.3.4	Ausschaltung von <i>FGF8-like1</i> und <i>FGF8-like2</i> durch RNAi führt zu einem <i>htl</i> -Phänotyp.....	57
3.4	FGF8-like1 und FGF8-like2 agieren als Liganden für den Htl-Rezeptor	59
3.5	Die Funktion von FGF8-like2 kann teilweise durch FGF8-like1 ersetzt werden.	61
3.6	Die Charakterisierung des FGF8-like1-Proteins.....	64
4	Diskussion	66
4.1	Der Aneuploidie-Ansatz zur Identifizierung neuer Gene.....	66
4.2	Die Identifizierung neuer Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in <i>Drosophila</i>	69
4.3	FGF8-like1 und FGF8-like2: Liganden für den Htl-Rezeptor.....	71
4.4	Gemeinsame und divergierende Funktionen von FGF8-like1 und FGF8-like2 während der frühen Entwicklung	72
4.5	Die frühe FGF-regulierte Entwicklung in anderen Organismen.....	75
4.6	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung	78
6	Literatur.....	79
7	Anhang.....	85

1 Einleitung

Zellmigration ist ein essentieller Prozess für die Entwicklung eines Embryos, beginnend mit der Bildung der Keimblätter bis hin zur Organogenese. Die aus Migrationsprozessen resultierende räumliche Verteilung von Zellen zum richtigen Zeitpunkt ist hierbei notwendig, um eine korrekte Spezifizierung und Differenzierung der entstehenden Zellen zu gewährleisten.

Die Wanderung von Zellen beruht auf verschiedenen Aktivitäten: [1] Mit Hilfe des Zytoskeletts bilden die Zellen zelluläre Ausläufer in die Wanderungsrichtung aus. Dabei erzeugen verschiedene Zelltypen unterschiedliche Ausläuferstrukturen wie Filopodien, Lamellipodien und Pseudopodien. [2] Die Bildung von neuen Zellkontakten in den Ausläufern verbindet dann das Aktinzytoskelett durch die Plasmamembran mit dem Substrat. Eine Hauptkomponente dieser Zellkontakte stellen Integrine dar, die nicht nur die Anheftung der Zelle an das Substrat vermitteln, sondern auch an der Aktivierung von Signaltransduktionswegen beteiligt sind. [3] Durch die anschließende Kontraktion der Aktinfilamente wird der Zellkörper in die Richtung der Wanderung verschoben, wobei bestehende Zellkontakte gelöst werden (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

Es wird deutlich, dass die Zellen für einen gerichteten Wanderungsprozess polarisiert sein müssen und dass das Aktinzytoskelett dabei eine wichtige Rolle spielt. Die Richtung der Wanderung und damit die Polarität der Zellen werden durch extrazelluläre Signale gesteuert, die sowohl stationär in der extrazellulären Matrix als auch als diffusibles Signal vorliegen können.

So bewegt sich z. B. der Schleimpilz *Dictyostelium* entlang eines Konzentrationsgradienten von zyklischem AMP (cAMP), ein Prozess, der als Chemotaxis bezeichnet wird, wobei cAMP in diesem Fall ein Attraktant darstellt (Weijer, 2004). Das cAMP-Signal wird auch als instruktives Signal bezeichnet, da es nicht für die Wanderung der Zellen an sich, sondern nur für die Richtung des Wanderungsprozesses benötigt wird. Im Gegensatz dazu übt z. B. das Protein Fibronectin, welches ein Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, während der Wanderung der Neuralleistenzellen im Hühnchenembryo eine permissive Funktion aus. Wenn die Integrine in den Neuralleistenzellen nicht an Fibronectin binden können, sind die Zellen nicht in der Lage zu wandern (Perris und Perissinotto, 2000).

Signale können nicht nur als Attraktant, sondern auch als Repellent wirken und verhindern dadurch, dass Zellen in falsche Positionen wandern. In *Drosophila* wandern die Keimzellen durch das Epithel des Mitteldarmprimordiums und dann weiter auf der basalen Seite des

Epithels in dorsaler Richtung. Die Expression von *wunen* und *wunen-2* in der ventralen Region des Mitteldarmprimordiums verhindert, dass die Keimzellen in diese ventrale Region einwandern (Santos und Lehmann, 2004).

Trotz der großen Vielfalt der Signalmoleküle (Zucker, Peptide, Stoffwechselprodukte und Membranlipide) haben alle Signale einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus: Nach der Bindung an Rezeptoren an der Zelloberfläche wird eine intrazelluläre Signalübertragung ausgelöst, die zu Änderungen im Zytoskelett führt.

Auch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellwanderungsprozessen (Szebenyi und Fallon, 1999). Obwohl viele Komponenten des FGF-Signalweges bekannt sind, bleiben einige Fragen offen: Wie beeinflusst der FGF-Signalweg Änderungen im Verhalten der Zellen in Bezug auf das Aktinzytoskelett oder die Zelladhäsion? Wie werden die für die Wanderung notwendigen Signale reguliert und woher wissen die Zellen, dass sie ihre endgültige Position erreicht haben? Die Mesodermwanderung im *Drosophila*-Embryo stellt ein gutes Modellsystem dar, um Untersuchungen zur FGF-vermittelten Zellmigration durchzuführen und allgemeingültige Erkenntnisse zu Migrationsprozessen zu erlangen.

1.1 FGF-vermittelte Zellwanderungsprozesse während der Entwicklung

In *Drosophila* gibt es zwei FGF-Rezeptoren, Heartless (Htl) und Breathless (Btl), die beide für Zellwanderungsprozesse in der Entwicklung benötigt werden. Die Funktion von Heartless in der Wanderung des Mesoderms wird in einem späteren Kapitel ausführlich besprochen (vgl. 1.3). Btl zusammen mit seinem FGF-Liganden Branchless (Bnl) wird für die Morphogenese der Tracheen, der Luftsäcke im dorsalen Thorax sowie der männlichen Genitalimaginalscheibe benötigt (Ahmad und Baker, 2002; Sato und Kornberg, 2002; Sutherland et al., 1996). Während der Embryogenese wird *breathless* zu Beginn der primären Tracheenverzweigung in 10 Gruppen von ektodermalen Tracheenvorläuferzellen exprimiert. Die Expression von *branchless* beginnt zur gleichen Zeit und beschränkt sich auf ektodermale und mesodermale Zellgruppen, die den Bereich der Tracheenvorläuferzellen umschließen. Die trachealen Zellen wandern daraufhin in diese FGF-signalisierenden Bereiche ein. Der FGF-Ligand Bnl agiert also als Chemoattraktant, das die direktionale Wanderung und die damit verbundenen primären Verzweigungen der Tracheen kontrolliert (Übersichtsartikel, Ghabrial et al., 2003; Ribeiro et al., 2002).

Auch in anderen Invertebraten werden Zellwanderungsprozesse durch den FGF-Signalweg kontrolliert. Der Nematode *Caenorhabditis elegans* besitzt einen FGFR-Rezeptor (EGL-15) und zwei FGF-Liganden (LET-756 und EGL-17), die durch die Aktivierung dieses Rezeptors unterschiedliche Funktionen ausüben (Birnbaum et al., 2005). LET-756 wird für die korrekte Wanderung und Positionierung der Axone im Bereich der ventralen Mittellinie benötigt (Birnbaum et al., 2005; Bülow et al., 2004) und übt zusätzlich eine eher generelle Funktion in der Regulierung des Flüssigkeitshaushaltes aus (Roubin et al., 1999). EGL-17 agiert als instruktives Signal, das die Wanderung der Geschlechtsmyoblasten in die Vulva kontrolliert. Die *egl-15*-exprimierenden Geschlechtsmyoblasten entstehen im posterioren Bereich der L1-Larve, wandern später in die Vulva ein, in der *egl-17* exprimiert wird, und entwickeln sich dort zu Muskelzellen (Burdine et al., 1998). Interessanterweise scheinen sich die Signalwege unterhalb des FGF-Rezeptors zu unterscheiden, da Mutationen in bestimmten Komponenten wie z. B. in dem Adaptorprotein SEM-5 nicht alle Phänotypen von *egl-15*-mutanten Tieren widerspiegeln (Borland et al., 2001). Dies ist ein Beispiel dafür, wie der gleiche Rezeptor unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung ausüben kann.

In Vertebraten ist die Regulation von Zellwanderungsprozessen durch FGFs aufgrund einer Vielzahl von *FGF*-Genen sehr komplex (z. B. 22 FGFs und 4 FGFRs in der Maus, Itoh und Ornitz, 2004). Da diese Prozesse im Einzelnen nicht beschrieben werden können, konzentrieren sich die Betrachtungen im Folgenden nur auf die während der Gastrulation auftretenden FGF-abhängigen Zellwanderungsprozesse in der Maus und im Hühnchen.

Der frühe Vogelembryo besteht aus dem Epiblast, der die Keimblätter bildet, und dem extraembryonalen Hypoblast. Die Gastrulation beginnt mit der Bildung des Primitivstreifens im Epiblast. Während der Gastrulation erfolgt eine Ingression der Epiblastzellen in den Primitivstreifen, wo sie dann eine epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen. Anschließend wandern die Zellen in den Bereich zwischen Epiblast und Hypoblast ein und bilden dort das Mesoderm und Endoderm. Obwohl der Mausembryo komplexer aufgebaut ist als der Vogelembryo, verläuft die Gastrulation sehr ähnlich. Der Epiblast im Mausembryo bildet eine zylindrische Struktur, auf deren ventraler Seite der Primitivstreifen entsteht. Die Epiblastzellen, die in den Primitivstreifen gelangen, durchlaufen auch hier eine epithelial-mesenchymale Transition und wandern dann ringförmig um den Epiblast, wo sie das Mesoderm und Ektoderm bilden (Übersichtsartikel, Böttcher und Niehrs, 2005).

In der Maus ist die Aktivität des FGF-Rezeptors1 (FGFR1) essentiell für die Gastrulation. *Fgfr1*-mutante Embryonen sterben während der späten Gastrulation und zeigen Defekte in der Zellspezifizierung, in der Musterbildung und in der Zellmigration (Yamaguchi et al., 1994).

Eine klonale Analyse hat gezeigt, dass *fgfr1*-mutante Epiblastzellen, die in den Primitivstreifen gelangen, keine epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen und daher nicht in der Lage sind, aus dem Primitivstreifen auszuwandern. Dieser Defekt beruht wahrscheinlich darauf, dass in den mutanten Zellen E-Cadherin überexprimiert und die Expression von *mSnail* runterreguliert wird (Ciruna und Rossant, 2001). Teilaspekte dieses mutanten Phänotyps zeigen sich auch in *fgf8*-mutanten Embryonen, in denen die Expression von *fgf4* unterdrückt wird. In *fgf8/fgf4*-mutanten Embryonen durchlaufen die Epiblastzellen eine normale epithelial-mesenchymale Transition. Der anschließende Wanderungsprozess der Epiblastzellen findet aber nicht statt, so dass kein mesodermales und endodermales Gewebe gebildet wird (Sun et al., 1999). Die epithelial-mesenchymale Transition der Epiblastzellen und die anschließende Wanderung dieser Zellen aus dem Primitivstreifen stellen also wahrscheinlich zwei voneinander unabhängige, durch FGFR1-regulierte Prozesse dar (Böttcher und Niehrs, 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Funktion von HSPGs (Heparan Sulfate-containing Proteoglycans) essentiell für die Aktivierung des FGF8-Signalweges ist. Das Gen *lazy mesoderm* (*lzme*) kodiert eine UDP-Glukose-Dehydrogenase, die für die Synthese von HSPGs benötigt wird. In *lzme*-mutanten Embryonen findet wie auch in *fgf8/fgf4*-mutanten Embryonen keine Wanderung der Epiblastzellen statt (Garcia-Garcia und Anderson, 2003).

Im Hühnchen agieren FGF8 und FGF4 als chemotaktische Signale, die die Bewegungen der Epiblastzellen während der Gastrulation koordinieren (Yang et al., 2002). Die Expressionsmuster beider Gene überlappen teilweise. Während FGF4 in allen Zellen des Primitivstreifens und im späteren Kopfbereich exprimiert wird (Shamim und Mason, 1999), ist FGF8 während der Wanderung der Epiblastzellen nur im Primitivstreifen exprimiert (Lawson et al., 2001). Implantationsexperimente ergaben, dass FGF8 als Repellent für die Epiblastzellen wirkt, FGF4 dagegen ein Attraktant darstellt. Die koordinierte Wanderung der anterioren Epiblastzellen aus dem Primitivstreifen in die Kopfregion wird also wahrscheinlich mittels einer Repulsion durch FGF8 und einer Attraktion durch FGF4 vermittelt (Yang et al., 2002). Die Wanderung der posterior gelegenen Epiblastzellen aus dem Primitivstreifen benötigt ebenfalls die Repulsion durch FGF8. Ein Attraktant für die laterale Wanderung dieser Zellen ist noch nicht bekannt.

Sowohl in der Maus als auch im Hühnchen wird also der FGF-Signalweg für die Wanderung der Epiblastzellen und damit für die Formation von Mesoderm und Endoderm benötigt.

1.2 Determination, Invagination und Wanderung des Mesoderms in *Drosophila*

Das Mesoderm entsteht auf der ventralen Seite des *Drosophila*-Embryos im Stadium des zellulären Blastoderms (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die Determination der Mesodermzellen wird durch hohe Konzentrationen des Transkriptionsfaktors Dorsal im Kern reguliert (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989). Dabei determiniert das Dorsal-Protein das mesodermale Schicksal der ventralen Zellen auf zwei Arten: Zum einen aktiviert es die mesodermspezifischen Gene *twist* und *snail* (Jiang et al., 1991), zum anderen inhibiert Dorsal die Expression von dorsalisierenden Genen (Ip et al., 1991; Rushlow et al., 1987). Die Expression von *twist* und *snail* erfolgt zuerst in einem schmalen Band von ventralen Zellen, die später die zentrale Population der Mesodermzellen darstellen. Zu Beginn der Gastrulation sind die Expressionsdomänen beider Gene expandiert und schließen das gesamte Mesodermprimordium ein (Leptin, 1991). Twist ist im Kern lokalisiert und agiert als transkriptioneller Aktivator, der für die Expression der meisten mesodermalen Gene notwendig ist. Der Transkriptionsfaktor Snail, der außer durch Dorsal auch von Twist reguliert wird, reprimiert die Expression von ektodermalen Genen innerhalb des Mesodermprimordiums (Ip et al., 1992). Sowohl *twist* als auch *snail* werden für die korrekte Ausbildung der ventralen Furche benötigt.

Die Bildung der ventralen Furche beruht auf Zellformveränderungen der ventralen Zellen, in denen *twist* und *snail* exprimiert werden. Diese ventralen Zellen können in zwei Populationen unterteilt werden: [1] Eine zentrale Population von Zellen, die eine Breite von ungefähr 12 Zellen aufweist und [2] eine periphere, 5 Zellen breite Population, die auf beiden Seiten die zentralen Zellen eingrenzt (Leptin und Grunewald, 1990; Sweeton et al., 1991). Die zentralen Zellen verringern ihre apikale Oberfläche und elongieren bis auf das 1,7-fache ihrer Normallänge, während sich ihre Zellkerne in basaler Richtung verschieben. Dadurch bildet sich eine Einstülpung des Epithels auf der ventralen Seite. Nach der Elongation verkürzen sich die zentralen Zellen wieder und invaginieren zusammen mit den peripheren Zellen in das Innere des Embryos (Kam et al., 1991; Leptin und Grunewald, 1990; Sweeton et al., 1991). Nachdem die peripheren Zellen invaginiert sind, schließt sich die ventrale Furche (vgl. Abb.E1).

Nach der Invagination des Mesoderms durchlaufen die Mesodermzellen eine epithelial-mesenchymale Transition, wobei die im Blastoderm etablierten Zelladhäsionsverbindungen gelöst werden (Oda und Tsukita, 1999). Der Verlust der epithelialen Strukturen ist nicht abhängig von den gleichzeitig stattfindenden Zellteilungen, da die Mesodermzellen in

cdc25/string-mutanten Embryonen, in denen keine mitotischen Teilungen stattfinden, eine normale epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen (Edgar und O'Farrell, 1990; Leptin und Grunewald, 1990). Interessanterweise wird zu diesem Zeitpunkt die Expression von E-Cadherin im Mesoderm durch die Aktivität von Snail reprimiert, während Twist gleichzeitig die Expression von N-Cadherin in allen mesodermalen Zellen aktiviert (Oda et al., 1998). Es konnte noch nicht geklärt werden, ob diese differentielle Expression von E- und N-Cadherin eine Auswirkung auf die epithelial-mesenchymale Transition hat.

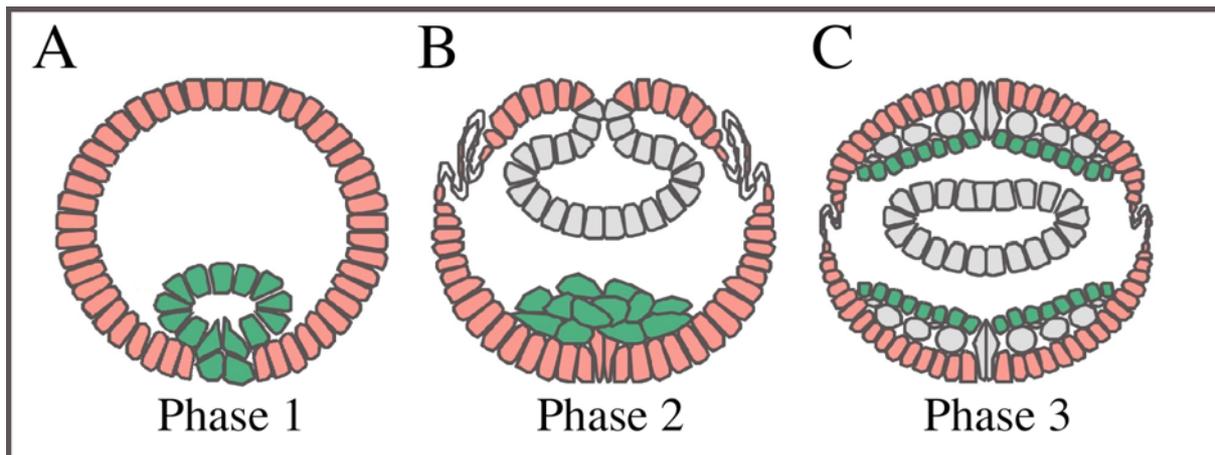


Abb.E1 Die Phasen der Mesodermwanderung in *Drosophila*

In diesem Schema sind die ektodermalen Zellen rosa und die mesodermalen Zellen grün eingefärbt. [A] Querschnitt durch einen Embryo im Stadium 7 (1.Phase der Wanderung). [B] Embryo im Stadium 8 (2.Phase). [C] Embryo im Stadium 9 (3.Phase). Modifiziert nach (Knust und Müller, 1998).

Der Prozess der gleichzeitig beginnenden Mesodermwanderung kann in drei unterschiedliche Phasen aufgeteilt werden (vgl. Abb.E1): In der 1. Phase stellen die Mesodermzellen des invaginierten Epithels durch zytoplasmatische Ausläufer Kontakt mit den benachbarten Ektodermzellen her (Schumacher et al., 2004; Wilson et al., 2004b). Nach dem Zusammenbruch der ventralen Röhre beginnt die 2. Phase, in der die mesodermalen Zellen in dorso-lateraler Richtung auf dem Ektoderm wandern. Die Frontzellen des wandernden Mesoderms strecken sich hierbei in Wanderungsrichtung aus und formen zelluläre Ausläufer. Diese Zellformveränderungen sind spezifisch für diese Phase der Wanderung, da sie nicht mehr beobachtet werden können, wenn die Mesodermzellen in der 3. Phase ihre endgültigen Positionen eingenommen haben und ein einschichtiges Gewebe bilden (Schumacher et al., 2004). Die Wanderung und die damit verbundenen Zellformveränderungen werden durch die Aktivität des FGF-Rezeptors Heartless (Htl) reguliert (vgl. 1.3, Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Schumacher et al., 2004).

Die dorso-laterale Migration der Mesodermzellen ist essentiell für die anschließende Differenzierung der Mesodermzellen. In *Drosophila* entstehen aus dem Mesoderm die somatische und viszerale Muskulatur, der Fettkörper, das larvale Herz und das somatische

Gewebe der Gonade. Die für die Differenzierung notwendigen, induktiven Signale gehen von den Ektodermzellen aus. So entstehen z. B. die Herzvorläuferzellen aus den dorsal positionierten Mesodermzellen durch die Induktion von Decapentaplegic (Dpp), das von den dorsalen Ektodermzellen exprimiert wird (Frasch, 1995; Staehling et al., 1994). Auch Wingless (Wg) ist notwendig für die Induktion der Herzvorläuferzellen (Park et al., 1996; Wu et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die kombinierten Aktivitäten von Dpp und Wg das Mesoderm in verschiedene Bereiche unterteilen, die dadurch unterschiedliche Kompetenzen erhalten (Carmena et al., 1998; Halfon et al., 2000). Die Induktion der Herzvorläuferzellen stellt ein Beispiel für diesen Mechanismus dar: Die kombinierte Aktivität von Dpp und Wg erzeugt eine Region im Mesoderm (eine so genannte „Vorgruppe“), in der das Gen *lethal of scute* exprimiert wird. Alle Zellen dieser Vorgruppe sind in der Lage, auf ein nachfolgendes Ras-Signal zu reagieren. Der Ras-Signalweg wird aber aufgrund einer lokalen Aktivierung des Heartless-Rezeptors nur in einigen Zellen der Vorgruppe eingeschaltet und aktiviert in diesen Zellen die Expression von *even-skipped (eve)* (Carmena et al., 1998). Da die *eve*-Expression den frühesten Marker für die Perikardialzellen darstellt, wird *eve* auch als „Identitätsgen“ der Perikardialzellen bezeichnet (Halfon et al., 2000). An diesem Beispiel wird gleichzeitig deutlich, dass der Htl-Rezeptor nicht nur für den Prozess der Mesodermwanderung, sondern später auch für die korrekte Differenzierung dorsaler Mesodermderivate benötigt wird (Michelson et al., 1998).

1.3 Regulation der Mesodermwanderung durch den FGF-Signalweg in *Drosophila*

Heartless wird im embryonalen Mesoderm exprimiert und in *heartless*-mutanten Embryonen ist der gerichtete Wanderungsprozess der mesodermalen Zellen gestört, was dazu führt, dass kein viszerales Mesoderm und kein Herzgewebe (daher der Name „heartless“) gebildet werden (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996). Heartless kodiert für einen FGF-Rezeptor. Die Signaltransduktion durch FGF-Rezeptoren wird durch die FGF-Ligandenbindung initiiert. Diese Bindung führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zur intermolekularen Autophosphorylierung bestimmter Tyrosine innerhalb des Rezeptordimers (Plotnikov et al., 1999).

Biochemische Studien weisen darauf hin, dass Glykosaminoglykane, die kovalent an ein Core-Protein gebunden sind (sogenannte HSPGs, Heparan Sulfate-containing Proteoglycans), für die Bildung des Rezeptor-Liganden-Komplexes notwendig sind (DiGabriele et al., 1998;

Ornitz et al., 1995; Ornitz und Leder, 1992; Schlessinger et al., 1995). Obwohl der Ligand für den Heartless-Rezeptor nicht bekannt war, konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass HSPGs auch in vivo an der Aktivierung von FGF-Rezeptoren beteiligt sind (Lin et al., 1999). Die Gene *sugarless* und *sulfateless* kodieren für Enzyme, die für die Biosynthese von HSPGs benötigt werden. Mutationen in den jeweiligen Genen prägen Phänotypen aus, die die Mesodermwanderungsdefekte in *htl*-mutanten Embryonen phänokopieren (Lin et al., 1999). Es ist nicht eindeutig geklärt, wie HSPGs die Bildung des Liganden-Rezeptor-Komplexes vermitteln. Es wird aber vermutet, dass HSPGs für die Dimerisierung der FGF-Liganden und die anschließende Interaktion mit der Heparansulfat-Bindungsstelle des Rezeptors notwendig sind (Venkataraman et al., 1996).

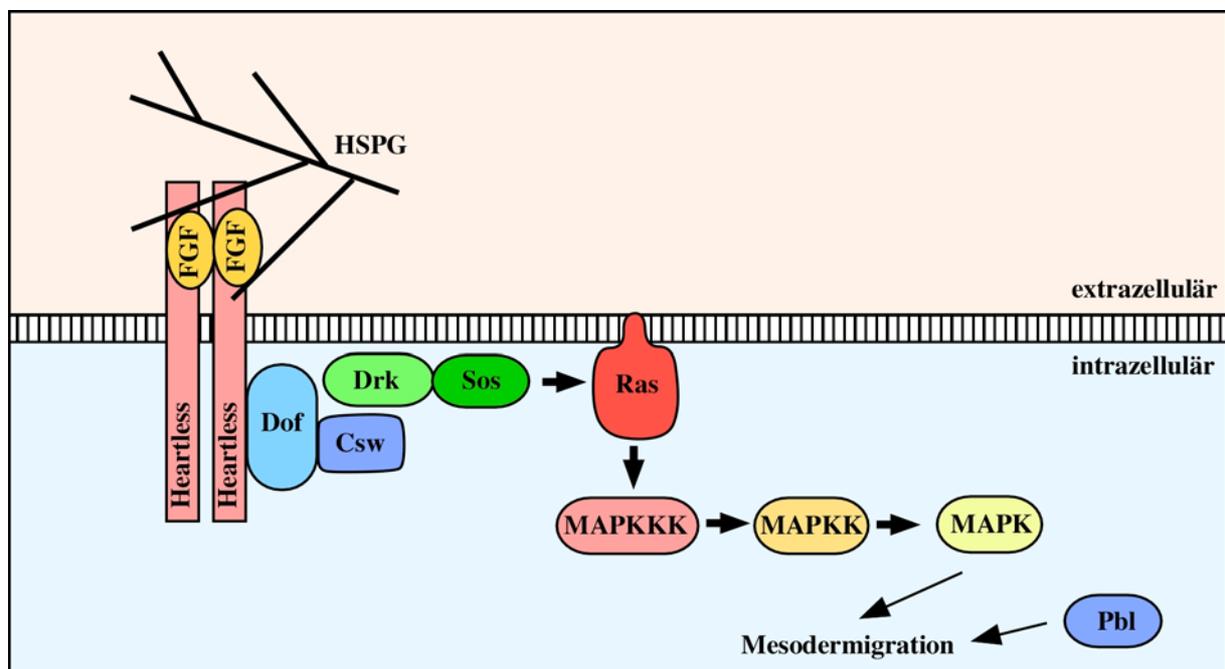


Abb.E2 Schematische Darstellung des Heartless-Signalweges

Erläuterungen finden sich im Text.

Nach der Aktivierung des Heartless-Rezeptors wird das Signal über den Ras-MAP-Kinase-Signalweg weitervermittelt (Gabay et al., 1997). In den meisten RTK-Signalwegen verbindet das SH2/SH3-Protein Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) die Rezeptor-Tyrosinkinase direkt mit der Ras-MAP-Kinase-Kaskade (Schlessinger und Bar-Sagi, 1994). FGF-Rezeptoren wie z. B. auch Heartless besitzen im Gegensatz zu anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen aber keine Grb2/Drk (Downstream of receptor kinases)-Bindungsstelle und benötigen daher zusätzliche Adaptorproteine (Kouhara et al., 1997).

In *Drosophila* wird diese Funktion von dem Adaptorprotein Dof (Downstream-of-FGF receptor) ausgeübt. *Dof* wird im Vergleich zu anderen Signalwegkomponenten ausschließlich in denjenigen Geweben exprimiert, in denen auch einer der FGF-Rezeptoren (kodiert von

breathless (btl) oder *heartless*) exprimiert ist. In *dof*-mutanten Embryonen ist die Wanderung des Mesoderms gestört (Vincent et al., 1998). Die Proteinstruktur von Dof weist zwei Ankyrin-Wiederholungen, eine coiled-coil-Domäne sowie ein DBB(Dof/BCAP/BANK) Motiv auf. Es konnte gezeigt werden, dass das DBB-Motiv für die FGF-abhängige Signaltransduktion notwendig ist und für eine effiziente Bindung an den Heartless-Rezeptor ausreicht (Battersby et al., 2003; Wilson et al., 2004a). Als zelluläres Substrat von Heartless wird Dof nach der Rezeptoraktivierung phosphoryliert und rekrutiert das Protein Corkscrew (Csw) in diesen Komplex (Petit et al., 2004; Wilson et al., 2004a). Corkscrew ist ein Homolog von SHP-2 aus Vertebraten und besitzt ebenso wie SHP-2 zwei aminoternale SH2-Domänen und eine zentral gelegene katalytische Domäne (Saxton und Pawson, 1999). Eine der SH2-Domänen von Csw ist für die Bindung an Dof notwendig (Petit et al., 2004). Es ist noch unklar, wie Grb2/Drk in den Dof/Csw-Komplex rekrutiert wird. Drk bindet über seine SH3-Domäne den GDP/GTP-Austauschfaktor Sos (Son of sevenless), der dadurch in die räumliche Nähe der Membran-assoziierten, monomeren GTPase Ras gebracht wird. Ras wird von Sos durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert und stimuliert durch die Interaktion mit Effektorproteinen wie z. B. Drf (MAP-Kinase-Kinase-Kinase) zahlreiche intrazelluläre Prozesse.

Die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade in den wandernden Mesodermzellen ist abhängig vom FGF-Signalweg, da in *htl*-oder *dof*-mutanten Embryonen keine aktivierte Form von ERK nachgewiesen werden kann (Gabay et al., 1997; Vincent et al., 1998). Interessanterweise wird die MAP-Kinase-Kaskade nicht in allen Mesodermzellen aktiviert, die auch *heartless* exprimieren. Die Aktivierung erfolgt früh nur in denjenigen Mesodermzellen, die nach der Invagination der ventralen Furche Kontakt zum Ektoderm haben und später ausschließlich in den Frontzellen des wandernden Mesoderms (Gabay et al., 1997). Der Mechanismus dieser differentiellen Regulation ist noch nicht geklärt.

Die aktivierte Form der MAP-Kinase phosphoryliert ein breites Spektrum von zytoplasmatischen und Membran-assoziierten Proteinen. Sie gelangt aber auch schnell in den Zellkern und phosphoryliert und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression und damit das Zellverhalten regulieren (Hunter, 2000). Der Htl-Rezeptor kontrolliert die Zellformveränderungen während der Mesodermmigration (Schumacher et al., 2004). Diese Zellformveränderungen sind wahrscheinlich unabhängig von der Transkription neuer Gene, da das schmale Zeitfenster zwischen der Aktivierung der Kaskade und den morphogenetischen Bewegungen des Mesoderms die Synthese neuer Proteine nicht zulässt (Wilson und Leptin, 2000).

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Pebble wird für die Funktion von Heartless in der Regulation der Zellformveränderungen benötigt. Pebble ist aber wahrscheinlich keine direkte Komponente des Heartless-Signalwegs, da *htl*- und *pbl*-mutante Embryonen auch unterschiedliche Phänotypen ausprägen (Schumacher et al., 2004). Andere Komponenten des FGF-Signalwegs, die die notwendige Reorganisation des Zytoskeletts regulieren, sind noch nicht bekannt.

Neben dem Ras-MAP-Kinase-Signalweg scheinen noch andere Signalwege für die Wanderung des Mesoderms notwendig zu sein, da eine aktivierte Form des Ras-Proteins die Mesodermwanderungsdefekte in *htl*- oder *dof*-mutanten Embryonen nicht vollständig retten kann (Michelson et al., 1998; Vincent et al., 1998). Die FGF-Signaltransduktion wird überwiegend durch drei Signalwege vermittelt: durch den MAP-Kinase-Signalweg, den Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase-Signalweg sowie den Phospholipase C γ (PLC γ)-Signalweg (Szebenyi und Fallon, 1999). Inwieweit diese Signalwege eine Funktion bei der Mesodermmigration in *Drosophila* ausüben ist noch nicht geklärt.

1.4 Themenstellung

Vor Beginn dieser Arbeit wurden durch einen genetischen Ansatz 7 chromosomale Regionen gefunden, deren Deletion in einer gestörten Mesodermmorphogenese resultiert. Ziel dieser Arbeit war es, in zwei Regionen auf dem 2. Chromosom die korrespondierenden Gene zu identifizieren und ihre Genfunktion während der Wanderung des Mesoderms zu analysieren. Dazu wurde zunächst die Lokalisation der für die Mesodermwanderung verantwortlichen Gene innerhalb der chromosomalen Regionen durch bereits vorhandene und neu hergestellte Deletionen bestimmt. Die verbliebenen Kandidatengene sollten dann durch die Analyse von Expressionsdaten (*in-situ*-Hybridisierungen, Mikroarray-Analysen) und das Ausschalten ihrer Genfunktion mit der Methode der RNA-Interferenz dahingehend untersucht werden, inwieweit sie eine Funktion während der Wanderung des Mesoderms ausüben. Die auf diese Weise isolierten Gene sollten kloniert und sequenziert werden, um dadurch ihre Genprodukte genauer zu charakterisieren. Die Erzeugung von Mutationen sowie genetische Epistasie-Experimente sollten dann zeigen, ob diese Gene für Komponenten des Htl-Signalweges kodieren und wo diese in den Signalweg eingreifen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen:

Acros, Geel, Belgien; *Baker*, Deventer, Niederlande; *Biomol*, Hamburg; *Bio-Rad*, München; *Difco*, Detroit, USA; *Fluka*, Buchs, Schweiz; *Gibco/BRL Life Technologies*, Karlsruhe; *Grüssing*, Filsum; *Merck*, Darmstadt; *Riedel-de Haën*; Seelze; *Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Sigma-Aldrich*, Steinheim

Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Bidest-H₂O angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim; *MBI Fermentas*, St. Leon-Rot; *New England Biolabs*, Schwalbach/Taunus und *Promega*, Madison, USA

Kitsysteme:

- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren
- GeneRacer Kit, *Invitrogen*, Groningen, Niederlande
- OneStep RT-PCR Kit, *Qiagen*, Hilden
- DIG RNA Labeling Mix, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim
- TOPO TA Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, Niederlande

Photoarbeiten und Bildverarbeitung:

Röntgenfilm:	Fuji SuperRX, <i>Fuji</i> , Tokyo, Japan
Röntgenfilm-Entwickler:	Tenetal Roentogen, <i>Tenetal</i> , Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer:	Tenetal Roentogen Superfix, <i>Tenetal</i> , Norderstedt
Photolichtmikroskop:	Zeiss Axiophot 2, <i>Zeiss</i> , Oberkochen
Konfokales Mikroskop:	Leica TCS NT, <i>Leica</i> , Heidelberg

Computersystem:	Macintosh PowerPC, <i>Apple</i> , Ismaning
Bildverarbeitung:	Adobe Photoshop 7, <i>Adobe Systems</i> , San Jose, USA Canvas 8, <i>Deneba Systems</i> , Miami, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen, DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA-Moleküle mit alkalischer Phosphatase (CIP), Phenol/Chloroform-Extraktion, Fällung von Nukleinsäuren, Ligation mit T4-DNA-Ligase und Gelelektrophorese sind in Sambrook et al., 1989, beschrieben und werden hier nicht mehr im Detail aufgeführt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren nach Angaben des Herstellers. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *SEQLAB*, Göttingen, durchgeführt.

2.2.1 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zur Transformation elektrokompenter Zellen wurde der *E. coli* Gene Pulser II von *Biorad*, München, gemäss den Angaben des Herstellers verwendet.

- Ligation 1:5 bis 1:10, isolierte DNA 1:50 bis 1:100 in H₂O verdünnen
- auf Eis 1 µl der DNA-Lösung zu 50 µl kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen, die Bakteriensuspension mit 450 µl LB auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäss überführen
- 1h bei 37°C inkubieren
- eine geeignete Menge auf eine LB_{amp}-Agarplatte (100µg/ml Ampicillin) ausstreichen und ü.N. bei 37°C inkubieren

Lösungen:

LB:	1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 1% NaCl
LB-Agar:	6.3g Agar/300ml LB
Ampicillin:	100mg/ml Stammlösung in H ₂ O

2.2.2 Isolierung von DNA

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Um nach einer Bakterientransformation möglichst schnell viele Bakterien-Einzelkolonien auf die enthaltene Plasmid-DNA zu testen, wird eine sog. 'Mini-Präp' durchgeführt. Diese erfolgte nach einem laborintern modifizierten Protokoll der Firma *Qiagen*, Hilden.

- 1ml einer ü.N.-Kultur für 2 min bei 13000rpm abzentrifugieren
- Pellet in 150 µl P1 resuspendieren
- 150 µl P2 zusetzen, invertieren
- 5min bei RT inkubieren
- 150 µl P3 zusetzen, invertieren
- 10min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 300µl Isopropanol fällen
- 30min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 5min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 20µl dH₂O aufnehmen

Lösungen:

- P1: 50mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNaseA, gelagert bei 4°C
P2: 200mM NaOH; 1% SDS
P3: 3.0M Kaliumacetat pH 5.5

Für Klonierungen, Sequenzierungen, *in vitro*-Transkriptionen und die Transformation von Fliegen wird DNA in größeren Mengen und von höherer Reinheit benötigt ('Midi-Präp'). Zu diesem Zweck wurde gemäß den Angaben des Herstellers das Plasmid Midi Kit der Firma *Macherey-Nagel*, Düren (Nucleobond AX), eingesetzt.

2.2.2.2 Präparation von genomischer DNA aus Fliegen

Nachfolgendes Protokoll stammt von E.J. Rehm vom Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) und wurde entsprechend den eigenen Anforderungen modifiziert:

- 30 Fliegen in Eppendorf-Gefäß sammeln und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- 200 µl Puffer A hinzugeben und Fliegen mit Bio-Vortexer (*Biospec Products*, Bartlesville, USA) homogenisieren, weitere 200 µl dazugeben und weiter homogenisieren

- für 30 min bei 65°C inkubieren
- Zugabe von 800 µl einer LiCl/KAc-Lsg zur Fällung der Proteine, anschließend mindestens für 10 min auf Eis inkubieren
- Zentrifugation für 15 min bei RT und 13000 rpm
- 1 ml des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen und DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 15 min bei RT und 13000 rpm fällen
- Pellet mit 70% EtOH waschen, trocknen und in 150 µl TE aufnehmen

Lösungen:

Puffer A : 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
 100 mM EDTA
 100 mM NaCl
 0,5% SDS
LiCl/KAc-Lsg.: 1 Teil 5 M KAc; 2,5 Teile 6 M LiCl
TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8.0

2.2.2.3 DNA-Extraktion aus Embryonen mittels Chelex

Chelex ist ein chelatierendes Harz, das eine hohe Affinität für polyvalente Metallionen besitzt. Es ist sowohl in der Lage, die Degradation von DNA durch Metallionen während des Erhitzens von biologischen Proben zu verhindern als auch Kationen aus der Probe zu entfernen, die wichtig für die Renaturierung von Enzymen sind, die eine spätere Manipulation der Probe beeinflussen könnten. Chelex liegt in Form von kleinen Kügelchen vor, die nicht wasserlöslich sind. Es wird in einer 5%igen Gewicht/Volumen-Mischung in sterilem Wasser angesetzt.

- 5 Embryonen in ein Eppendorf-Gefäß mit dH₂O überführen
- Überstand möglichst vollständig abziehen
- Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Mörser herstellen: dazu eine 1 ml Plastikspitze über einer Flamme erhitzen und die geschmolzene Spitze in ein Eppendorf-Gefäß drücken
- Probe aus dem Stickstoff holen und noch im gefrorenen Zustand mit dem Mörser zerkleinern; für jede Probe einen neuen Mörser benutzen
- 50 µl Chelex dazugeben und abermals mörsern
- für 10 min in kochendes Wasser stellen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen und anschließend kurz zentrifugieren

Für eine PCR-Reaktion werden 1-10 µl des Überstandes eingesetzt.

2.2.2.4 DNA-Extraktion aus einzelnen Fliegen

- betäubte Fliege in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- Fliege in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Fliege in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) geben, 50 µl SB-Lösung hinzufügen und für 10 sec mörsern
- Vertiefung mit Tesafilm abdichten und für 15 min auf RT inkubieren
- Platte für 5 min zwischen zwei 100°C warme Heizblöcke stellen (Inaktivierung der Proteinase K)
- den unteren Heizblock entfernen und die Platte zusammen mit dem oberen Heizblock auf RT abkühlen lassen

Für eine PCR-Reaktion werden 5 µl des Überstandes eingesetzt.

Lösungen:

SB: 10mM Tris-HCl, pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteinase K

2.2.3 Isolierung von polyA⁺-RNA

Die Isolierung von polyA⁺-RNA aus Embryonen erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe des µMACS mRNA Isolation Kits der Firma *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach. Der Anreicherungseffekt beruht dabei auf der Bindung des poly(A)-Schwanzes der meisten mRNA's an die magnetischen MACS Oligo (dT) MicroBeads. RNA-Populationen ohne poly(A)-Schwanz (rRNA und tRNA) werden dagegen ausgewaschen. Die so gewonnene polyA⁺-RNA wurde für Northern-blots, RT-PCR, 5'- und 3'-RACE verwendet.

2.2.4 Northern-blot

Northern blotting beschreibt den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter RNA (Gesamt- oder polyA⁺-RNA) auf eine Membran, gefolgt von einer Hybridisierung mit markierten Sonden zum Nachweis spezifischer RNA-Fragmente.

- unter dem Abzug ein RNA-Gel gießen
- je antisense-RNA-Sonde zwei polyA⁺-RNA-Proben (0-14h und 14-24h) à ca. 5µg und einen RNA-Längenstandard vorbereiten
- Gellauf bei 100V in 1xMOPS
- Vorbereitung des Northern blots:

- Nylonmembran (Hybond N⁺) zuschneiden: 12cm x 16cm; 3x Whatman-Papier zuschneiden: 12cm x 16cm; 1x Whatman-Papier zuschneiden: 16cm x 24cm
- Geldokumentation anfertigen; dabei ein Lineal links am Gel anlegen, so dass sich der Nullpunkt auf Höhe der Geltaschen befindet
 - Gel für 15min in dest.H₂O schwenken
 - Gel für 2x 15min in 10xSSC schwenken
 - Aufbau des Northern blots:

Auf eine Glasplatte wird das 16cm x 24cm Whatman-Papier so aufgelegt, dass es beidseitig in ein mit 10xSSC gefülltes Pufferreservoir hineinreicht; RNA-Gel luftblasenfrei auflegen und mit Parafilmstreifen vollständig umranden; Nylonmembran passend und luftblasenfrei auf das RNA-Gel auflegen; mit den drei vorher in 10xSSC angefeuchteten 12cm x 16cm Whatman-Papieren ebenso verfahren; 'Apura'-Papierstapel (ca. 6cm dick) auflegen; großen Gelträger auflegen und mit Gewicht (ca. 500g) beschweren
 - RNA-Transfer über Nacht (ca. 18h)
 - Abbau des Northern blots:

Nylonmembran und RNA-Gel zusammenlassen, bis die Geltaschen mit einem Kugelschreiber auf der Membran markiert sind (RNA-Seite & Referenzpunkt); Membran und Gel trennen und Transfer unter UV-Licht überprüfen; Nylonmembran trocknen lassen, beschriften und durch UV-Bestrahlung (120mJ) die RNA auf der Nylon-Membran fixieren ('crosslinken'); bis zur Hybridisierung zwischen zwei 'Apura'-Papieren aufbewahren
 - Nylonmembran/RNA mit 15ml Vorhybridisierlösung in einer Plastiktüte einschweißen und für mindestens 1h im Wasserbad bei 68°C inkubieren
 - Hybridisierlösung (7ml) vorbereiten:

antisense-RNA-Sonde (ca. 1.5µg) in 100µl Hybridisierlösung für 5min aufkochen und anschließend auf Eis abkühlen
 - Vorhybridisierlösung durch Hybridisierlösung inkl. antisense-RNA-Sonde ersetzen und über Nacht im Wasserbad bei 68°C inkubieren
 - Nylonmembran/RNA bei RT für 2x 5min in jeweils 50ml 2xSSC/0.1%SDS waschen
 - 2x 15min bei 68°C in jeweils 50ml 0.1xSSC/0.1%SDS waschen
 - Äquilibrieren in Wasch-Puffer
 - für 1h in Blockierlösung inkubieren
 - 1h in Blockierlösung + anti-DIG-Meerrettichperoxidase-AK (1:10000) schwenken

- 2x 15min in Waschpuffer schwenken
- 2x 5min in TBS-T schwenken; währenddessen Färbelösung herstellen (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche, 5ml Lösung A mit 50µl Lösung B mischen und im Dunkeln auf Raumtemperatur erwärmen lassen)
- Färbelösung auf Nylonmembran/RNA bringen, 90sec stehen lassen
- Nylonmembran/RNA abtropfen lassen, in Folie in eine Röntgenfilmkassette legen und in der Dunkelkammer einen Röntgenfilm auflegen (Expositionsdauer wenige sec bis einige min)

Lösungen:

RNA-Gel:	1.5g Agarose + 10ml 10xMOPS + 87ml H ₂ O aufkochen, bei ca. 70°C Zugabe von 5.1ml 37% Formaldehyd, mischen und Gel giessen; Laufpuffer: 1xMOPS
Proben:	xµl RNA (5µg), 10µl deionisiertes Formamid, 4µl 37% Formaldehyd, 3µl 10xMOPS, 1µl Ethidiumbromid (400 µg/ml) mischen; 5min bei 65°C inkubieren; anschliessend auf Eis stellen, 3µl Blaumarker hinzufügen und aufs Gel auftragen
Probenpuffer:	70% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol
10xMOPS:	0.2M MOPS, 0.05M Natriumacetat, 0.01M EDTA
20xSSC:	3 M NaCl, 0.3M Natriumcitrat, pH 7.4
Hybridisierlösung:	5xSSC, 50% Formamid, 0.1% Natriumlaurylsarcosin, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagenz (Roche)
10xTBS:	200mM Tris-HCl pH 8, 1.5M Natriumchlorid
1xTBS-T:	1xTBS, 0.2% Tween

2.2.5 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die gezielte Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen. Zwei auf den entgegengesetzten DNA-Strängen lokalisierte Oligonukleotide (‘Primer’) dienen dabei als Startstellen für eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase). Durch sich wiederholende Zyklen aus Aufschmelzen der DNA, Bindung der Oligonukleotide und Strangsynthese wird die zwischen den ‘Primern’ liegende DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt. Neben der Standard-PCR wurden im Laufe dieser Arbeit auch einige Weiterentwicklungen wie RT-PCR, 5’-RACE und 3’-RACE angewandt. Für alle PCR-Anwendungen wurde der Thermocycler PTC-200 der Firma *MJ Research*, Watertown, USA, eingesetzt. Die Aufreinigung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem NucleoSpin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren. Für ihre nachfolgende Subklonierung wurde, falls nicht künstliche Schnittstellen eingeführt worden waren, der TOPO TA Cloning Kit von *Invitrogen*, Groningen, Niederlande, nach Herstellerangaben benutzt

2.2.5.1 Standard-PCR

Die PCR auf Plasmid- oder genomischer DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll.

Die typischen Komponenten eines 50µl Reaktionsansatzes stellten sich dabei wie folgt dar:

- x µl DNA
- 1 µl Forward-Primer (10µM)
- 1 µl Reverse-Primer (10µM)
- 1 µl-dNTP-Mix (je 25 mM)
- 6 µl MgCl₂ (25 mM)
- 5 µl Pfu-Puffer
- 1 µl Pfu-Polymerase
- ad 50 µl dH₂O

Ein passendes Standard-PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

	Dauer	Temperatur	Bedeutung
	5min	94°C	Denaturierung der DNA
30x	30sec	94°C	Denaturierung der DNA
	1min	´Primer´-abhängig	Bindung der ´Primer´ an die ´template´-DNA (´Annealing´)
	1min	72°C	DNA-Synthese (´Elongation´)
	10min	72°C	finale DNA-Synthese (´Elongation´)
	4ever	4°C	Reaktionsende

Tab. M1 Standard-PCR-Programm

Folgende Oligonukleotide wurden zur Standard-PCR eingesetzt:

Name	Sequenz (5' →3')	AT	Verwendung
CG13194 Pfor*	T7-Prom.-CCAAATCGCGTCGCC-CAACAA	60°	RNAi
CG13194 Prev*	T7-Prom.-GCTGCTCGCGCTCCC-ACAACCTC	60°	RNAi
RNACG12443for*	T7-Prom.-CAACGGCGGCCACTA CCTC	61°	RNAi
RNACG12443 rev*	T7-Prom.-TTGCGGACGTGATGC-TGGATGT	61°	RNAi
UAS CG12443 for	AAGGAAAAAAGCGGCCGCAC-GCCGAAACTGCCAATG	58°	Effektorkonstrukt FGF8-like1
UAS CG12443 HArev	CCGCTCGAGCGGCTTATTCGG-CCTTATCCTGTTTCAT	58°	Effektorkonstrukt FGF8-like1
13194 Stopfor	AATGACGATGAAACGATACGA- <u>ATTC</u>	50°	Vervollständigung cDNA FGF8-like2

13194 Stoprev	CG <u>GGATC</u> CTTCCGGATTGCGA-GATGA	50°	Vervollständigung cDNA FGF8-like2
Primer A	CCATTCGGCGGTATTAGACA	55°	Kartierung der Exzisionslinien
Primer B	CGACGCAACGACGACACGA	55°	Kartierung der Exzisionslinien
Up-Primer	GACGGGACCACCTTATGTTAT-TTCATCATG	55°	Kartierung der Exzisionslinien
Exon5for	AGTCCGCCCGATGCTGATA	54°	Kartierung der Exzisionslinien
Exon5rev	ACCTGAGGCCACGAAGAAGTTT	54°	Kartierung der Exzisionslinien
CG13193for	TGGACTGCCGATTGATTTATG-AGC	57°	Kartierung der Exzisionslinien
CG13193rev	ACACCGGTCCGCCAGATTCC	57°	Kartierung der Exzisionslinien

Tabelle M2: Zur Standard-PCR eingesetzte Oligonukleotide

Alle mit einem * gekennzeichneten Oligonukleotide tragen am 5'-Ende die 27bp lange T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC-3'), die eine *in vitro*-Transkription im Anschluss an die PCR erlaubt. Um die Subklonierung der PCR-Produkte zu erleichtern, wurden künstliche Restriktionsschnittstellen eingeführt (**fett** gedruckte und unterstrichene Basen). AT = Annealing-Temperatur.

2.2.5.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR geht der eigentlichen PCR eine reverse Transkription ('RT') voraus, in der ausgehend von polyA⁺-RNA einzelsträngige DNA gebildet wird. Ermöglicht wird dies durch reverse Transkriptasen. Neben ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Funktion besitzen diese eine RNase H-Aktivität zum Abbau der RNA im entstehenden RNA-DNA-Hybrid. Zunächst wird die RNA in der eigentlichen RT-Reaktion revers transkribiert, entweder die gesamte polyA⁺-RNA-Population mithilfe eines Oligo-dT-´Primers´ oder nur die gewünschte Subpopulation durch den Einsatz eines genspezifischen ´Primers´ (wie im vorliegenden Fall), gefolgt von einer PCR mit genspezifischen ´Primern´. Es wurde das OneStep RT-PCR Kit der Firma *Qiagen*, Hilden, nach Herstellerangaben verwendet, welches RT-Reaktion und nachfolgende PCR in einem Ansatz kombiniert.

Nachfolgende Oligonukleotide wurden für die RT-PCR eingesetzt:

Name	Sequenz (5' → 3')	AT	Verwendung
CG12443 RT5.1*	TAGAAACGTGCCCCCAATAAA-GTA	55°	RT-PCR von FGF8-like1
CG12443 RT3.1*	AAATGTTGTTGCCTGTGAAAG-TGG	55°	RT-PCR von FGF8-like1
CG12443 RT5.2	ACGCCGAAACTGCCCAATGT	55°	RT-PCR von FGF8-like1

CG12443 RT3.2	CTAATAGCCAAAATGCGTCAA-TCC	55°	RT-PCR von FGF8-like1
---------------	---------------------------	-----	-----------------------

Tabelle M3: Zur RT-PCR eingesetzte Oligonukleotide

Alle mit einem * gekennzeichneten Oligonukleotide wurden für die genspezifische, reverse Transkription eingesetzt. AT = Annealing-Temperatur.

2.2.5.3 3'-RACE

Im Gegensatz zur RT-PCR ermöglicht die RACE-Technologie (Rapid Amplification of cDNA Ends) die spezifische Amplifikation auch unbekannter Sequenzen. Eine am 5'- u./o. 3'-Ende unvollständige cDNA lässt sich so ohne zusätzliche Sequenzinformationen in beide Richtungen vervollständigen. Im Laufe dieser Arbeit wurde das GeneRacer-Kit der Firma *Invitrogen*, Groningen, Niederlande, eingesetzt. Im Falle des 3'-RACE wurde für die RT-Reaktion der GeneRacer Oligo-dT-´Primer´ mit Ankersequenz verwendet, gefolgt von einer PCR mit einem Anker-´Primer´(GeneRacer 3') und einem genspezifischen ´Primer´(Forward GSP).

Zur 3'-RACE eingesetzte Oligonukleotide:

Name	Sequenz (5' → 3')	AT	Verwendung
Forward GSP CG13194	GCCAGCGGAAGCAACGGATAC-CA	65°	RACE-PCR von FGF8-like2
GeneRacer 3' (<i>Invitrogen</i>)	GCTGTCAACGATACGCTACGT-AACG	65°	RACE-PCR von FGF8-like2

Tab. M4 Zur 3'-RACE eingesetzte Oligonukleotide

AT = Annealing-Temperatur

2.2.6 Herstellung der verwendeten Plasmid-Konstrukte

2.2.6.1 Die cDNA von *FGF8-like1*

Die cDNA von *FGF8-like1* wurde durch eine RT-PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern (s. 2.2.5.2) amplifiziert und anschließend mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits von *Invitrogen*, Groningen, Niederlande, nach Herstellerangaben subkloniert.

2.2.6.2 Die cDNA von *FGF8-like2*

Um eine vollständige cDNA von *FGF8-like2* zu erhalten, wurde ein RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-Ansatz durchgeführt (s. 2.2.5.3). Die so erhaltene, 3.2 kb große cDNA war aber im 3'-Bereich unvollständig, da kein Stopcodon identifiziert werden konnte, und wies in der Nähe des Transkriptionsstarts eine Basenpaardeletion auf. Der fehlende 3'-Bereich wurde mit genspezifischen Primern von genomischer DNA amplifiziert (s. 2.2.5.1)

und über interne Schnittstellen in die cDNA kloniert. Das deletierte Basenpaar wurde durch eine Mutagenese-PCR eingefügt. Hierzu wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von *Stratagene*, La Jolla, USA, nach Herstellerangaben benutzt.

2.2.6.3 Das pUAS-*FGF8-like1*-Effektorkonstrukt

Um ein pUAS-*FGF8-like1*-Effektorkonstrukt herzustellen, wurde die cDNA von *FGF8-like1* unter Verwendung von geeigneten Primern mittels PCR amplifiziert (s. 2.2.5.1) und in den pUAS-HA-Transformationsvektor kloniert. Die C-terminale Fusion von Hämagglutinin (HA) an *FGF8-like1* ermöglicht dessen Detektion mittels eines HA-spezifischen Antikörpers.

2.3 Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster*

2.3.1 Keimbahntransformation

Die Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster* stellt eine einfache Methode zur Erzeugung transgener Fliegenstämme dar. Für den Gentransfer werden dabei transponierbare Elemente, sogenannte P-Elemente, genutzt. Diese benötigen eine Transposase sowie als deren Erkennungssequenzen flankierende 'inverted repeats', um in ein Genom integrieren zu können. Für die Technik der Keimbahntransformation sind diese beiden Komponenten auf unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert. Während in den P-Element-Transformationsvektoren die zu übertragende DNA zwischen den 'inverted repeats' lokalisiert ist, stellt ein sogenanntes Helfer-Plasmid (pUChsp Δ 2-3) die Transposase zur Verfügung, die in trans für eine Integration des P-Elementes ins Fliegen-genom sorgt.

2.3.1.1 Herstellung der Injektionslösung und der Injektionskapillaren

Sowohl die DNA des P-Element-Transformationsvektors, als auch die des Helferplasmids wurden mit dem Nucleobond AX Midi Kit der Firma *Macherey-Nagel*, Düren, isoliert und für den Injektionsmix etwa 4 μ g P-Element-Transformationsvektor und 1 μ g Helfer-Plasmid (pUChsp Δ 2-3) gemischt. Desweiteren wurden 1 μ l 10xInjektionspuffer sowie 1 μ l 2% Phenolrot zugefügt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Vor dem Befüllen der Kapillaren mit der Injektionslösung wird dieser 5min bei 13000rpm zentrifugiert, um Schwebeteilchen, die die Kapillare verstopfen könnten, abzutrennen.

Glaskapillaren (GB120F-10, *Science Products GmbH*, Hofheim) wurden mit dem Flaming/Brown Micropipette Puller (*Sutter Instrument Co.*, USA) mit dem 2-Schritt-

Programm 33 gezogen und danach 5 min unter einem Anstellwinkel von ca. 30° geschliffen (*Bachofer*, Reutlingen). Die Befüllung der Kapillare erfolgte mit Hilfe einer ausgezogenen Glaspipette von hinten.

Programm 33:

1.)	Heat = 460	Pull = 0	Vel. = 30	Del. = 50
2.)	Heat = 460	Pull = 100	Vel. = 60	Del. = 5

Lösungen:

10xInjektionspuffer: 5mM KCl, 0.1mM Na-Phosphatpuffer, pH 6.8

2.3.1.2 Mikroinjektion

Für die Injektionen werden w^- -Embryonen (w^{118}) benutzt. Da alle P-Element-Transformationsvektoren ein w^+ -Gen tragen, welches ins Fliegen genom mitintegriert, können transgene Fliegen anhand ihrer Augenfarbe (von schwach gelb bis dunkelrot, je nach Insertionsort) erkannt werden.

Die Injektion in den posterioren Teil der w^- -Embryonen erfolgt vor Bildung der Polzellen, welche die spätere Keimbahn der Fliege bilden. Nur so bietet sich die Möglichkeit, dass die DNA bei der Zellbildung internalisiert und ins Genom der Polzellen integriert wird. Dies ist bis etwa 1.5h nach Befruchtung möglich, weil der Embryo bis dahin ein Synzytium von sich teilenden Kernen darstellt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die w^- -Fliegen zur Eiablage etwa zwei Tage vor Beginn der Mikroinjektion auf Apfelsaft-Agarplatten zu setzen und diese häufiger zu wechseln, da dann mehr Eier gelegt werden und die Embryonen einer Ablage vom Alter her synchronisiert sind.

w^- -Fliegen werden für ca. 20 min auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt und die abgelegten Eier von Hand oder chemisch (2 min in einem 1:1 Gemisch aus Natriumhypochlorid und H_2O , anschliessend gut waschen) dechorionisiert. Anschliessend werden die Embryonen in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen aufgereiht und auf ein vorher mit Kleber bestrichenes Deckglas übertragen. Nun lässt man die Embryonen unter optischer Kontrolle trocknen, bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel in der Vitellinmembran Falten bilden. Das Deckglas wird auf einem Objektträger fixiert und die Embryonen mit 3S Voltalef-Öl überschichtet. Die Injektionen erfolgen mittels Druckluft (Pneumatic PicoPump PV 820, *World Precision Instruments Inc.*, Sarasota, USA) unter dem Durchlicht-Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) mit dem motorisierten Mikromanipulator (Piezo Manipulator PM 10). Die Injektion in den Embryo kann durch den Phenolrot-Zusatz in der Injektionslösung gut

kontrolliert werden. Fertig injizierte Embryonen werden mit 3S Voltalef-Öl überschichtet und bis zum Schlüpfen in einer feuchten Kammer bei 18°C aufbewahrt. Geschlüpfte L1-Larven werden zu 50 Individuen in ein vorbereitetes frisches Fliegenröhrchen (Brei wird angefeuchtet, aufgelockert und mit einem Tupfer Hefe versehen) gesammelt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen ebenfalls bei 18°C gehalten.

Lösungen:

Kleber:	tesa-Pak Paketklebeband (<i>Beiersdorf</i> , Hamburg) einige Tage in Heptan einweichen, dann abzentrifugieren und Überstand verwenden
Apfelsaft-Agarplatten:	40g Agar, 340ml Apfelsaft (100%) und 17g Rohrzucker mit H ₂ O auf 1l auffüllen, aufkochen, nach Abkühlen auf 60°C mit 30ml 10% Nipagin versetzen und Platten giessen
10% Nipagin:	100g Nipagin in 1l 70% Ethanol lösen

2.3.1.3 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen

Den geschlüpften Tieren (G_0) aus der F1-Generation kann nicht angesehen werden, ob eine Insertion der injizierten DNA erfolgt ist, da diese in der Regel nicht die somatischen, sondern nur die Keimbahnzellen betrifft. Aus diesem Grund wird jedes G_0 -Tier gegen 3 Tiere mit dem Genotyp $w^-/w^-(Y)$; *Gla/CyO* (weißäugig mit zweitchromosomalem Balancer) gekreuzt. Unter deren Nachkommen befinden sich rotäugige Tiere, wenn es zu einer Keimbahntransformation des G_0 -Tieres gekommen ist. Zur Ermittlung des Insertionsortes des P-Elementes auf dem ersten, zweiten oder dritten Chromosom bedarf es weiterer Kreuzungen gegen erst-, zweit- und dritschromosomale Balancerchromosomen. Stämme, die homozygot nicht lebensfähig sind, werden balanciert etabliert und gehalten. Im Falle von Mehrfachinsertionen wird versucht, diese zu trennen, separat auszukreuzen und zu etablieren.

2.3.2 RNA-Interferenz

RNAi ermöglicht es, ein Gen durch die Injektion der entsprechenden doppelsträngigen RNA (dsRNA aus sense- und antisense-Strang) gezielt auszuschalten. Sie ist insbesondere dann informativ, wenn zu einem Gen keine konventionell erzeugte Mutante existiert.

Das vorliegende Protokoll basiert auf der Arbeit von Kennerdell und Carthew, 1998, und wurde entsprechend den eigenen Erfahrungen stellenweise modifiziert.

2.3.2.1 Herstellung der ds-RNA mittels PCR

Für die Herstellung der dsRNA wurde die PCR-Methode gewählt, da sie in jedem getesteten Fall grosse Mengen der geforderten dsRNA lieferte. Die 'Primer' für die PCR wurden dabei

so ausgewählt, dass die Produkte aus dem kodierenden Bereich stammten und eine Länge von ca. 500bp aufwiesen. Essentiell für die PCR-Methode ist das Anhängen der aus 27bp bestehenden T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz an das 5'-Ende der 'Primer' (vgl. 2.2.5.1). Diese Vorgehensweise erlaubt eine *in vitro*-Transkription auf dem PCR-Produkt, wobei direkt die dsRNA gebildet wird. Für die *in vitro*-Transkription wurde das RiboMAX Large Scale RNA Production System von *Promega*, Madison, USA, laut Herstellerangaben verwendet.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

- PCR (in 50µl) mit den ausgewählten 'Primern'
- Phenol/Chloroform-Extraktion, Fällung, Aufnehmen des Pellets in 20 µl dH₂O
- *in vitro* Transkription mit der T7-Polymerase auf 1µg PCR-Produkt
- Zugabe von 1µl DNase I, Inkubation für 15min bei 37°C
- Phenol/Chloroform-Extraktion, Fällung, Aufnehmen des Pellets in 20 µl dH₂O
- Konzentrationsbestimmung, Aliquotierung und Lagerung der dsRNA bei -70°C

2.3.2.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion erfolgte wie unter 2.3.1.2 beschrieben, anstelle von *w*⁻-Embryonen wurden jedoch Wildtyp-Embryonen des Stammes Oregon R verwendet. Da im Umgang mit RNA aufgrund von RNasen mit besonderer Sorgfalt gearbeitet werden muss, wurden alle im Folgenden vorgestellten Lösungen mit RNase-Inhibitor versetzt und die Injektionskapillaren für 2h bei 180°C gebacken. Der Injektionsmix setzte sich zusammen aus 1µl 10xInjektionspuffer, 1µl 2% Phenolrot und x µl dsRNA (Endkonz. max. 5µM), aufgefüllt auf 10µl mit dH₂O.

2.3.2.3 Antikörperfärbung an injizierten Embryonen

- Injizierte Embryonen bis zum gewünschten Entwicklungsstadium unter Öl in einer feuchten Kammer bei 18°C lagern
- 3S Voltalef-Öl abtropfen lassen und die Embryonen mit Heptan vom Deckglässchen abspülen
- Embryonen in einem Gemisch aus 10:3:7 Heptan/37% Formaldehyd/1xPBS für 30 min bei RT fixieren

- Embryonen mit einem Netz aus der Interphase sammeln, mit 1xPBS abspülen, auf doppelseitigem Klebeband befestigen und mit 1xPBS überschichten
- Embryonen manuell mit einer Glaskapillare devitellinisieren und Antikörperfärbung durchführen (s. 2.5.2)

2.4 Genetische Methoden

2.4.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte auf Standardmedium bei 18°C, RT und 25°C. Eiablagen wurden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit einem Tupfer Hefe versehen wurden.

Lösungen:

Standardmedium: 356g Maisschrot, 47.5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10% Nipagin, 22.5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup ⇒ mit 4.9l dH₂O auffüllen

2.4.2 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

In den folgenden Tabellen sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme (Balancer-Chromosomen und mutante Fliegenstämme) zusammengefasst

2.4.2.1 Balancer-Chromosomen

Chromosom	Symbol	Marker
2	<i>CyO</i>	Cy[1] dp[lvI] pr[1] cn[2]
2	<i>CyO, P[ftz::LacZ]</i>	Cy[1]
2	<i>SM5</i>	al[2] ds[55] Cy[1] lt[v] cn[2] sp[2]
2	<i>SM6a</i>	al[2] Cy[1] dp[1vI] cn[2P] sp[2]
3	<i>MKRS</i>	M(3)76A1 kar[1] ry[2] Sb[1]
3	<i>TM6B</i>	Antp[Hu] e[1]
3	<i>TM3, P[ftz::LacZ]</i>	P[ftz-lacZ.ry+] Sb[1] ry

Tab.M5 Balancer-Chromosomen

2.4.2.2 Mutante Fliegenstämme

Deletionen

Stock	Genotyp	Bruchpunkte	Referenz
3344	<i>Df(2L)prd1.7, b[1] Adhn[2] pr[1] cn[1] sca[1]/CyO, P{ry+t*=elav- lacZ.H}YH</i>	33B02-03; 34A01-02	Bloomington stock center
3138	<i>Df(2L)b87e25/CyO</i>	34B12-C01; 35B10C01	Bloomington stock center
1642	<i>Df(2R)vg135, nomp[A]vg135/CyO, S* bw[1]</i>	49A-B; 49D-E, 47F04- 48A;49A-B (Inv assoziiert mit Defizienz)	Bloomington stock center
1143	<i>Df(2R)en28/SM5</i>	48A01-02; 48B-C01	Bloomington stock center
752	<i>Df(2R)vg-B/SM5</i>	49D03-04;49F15-50A03	Bloomington stock center
596	<i>Df(2R)stan2, b[1] pr[1]P{ry+t7.2=neo FRT}42D/Cy</i>	046F01-02;047D01-02	Bloomington stock center
520	<i>Df(2R)E3363/CyO, P{ry+t7.2=sevRas1.V 12}FK1</i>	47A;47F	Bloomington stock center
190	<i>Df(2R)en-A/CyO</i>	47D03;48B02	Bloomington stock center
46900	<i>Df(2R)vg-C/SM5</i>	49B2-3;49E7-F1	Umea stock center
4960	<i>Df(2R)CB21/CyO; ry506</i>	48E;49A	Bloomington stock center
1702	<i>Df(2R)X1, Mef2X1/CyO, AdhnB</i>	46C;47A01	Bloomington stock center

Tab. M6 Deletionen

RS5- und RS3-P-Elemente in der *prd*-Region

Stock	Genotyp	Insertionsort	Referenz
CB-0356-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	34A4	Szeged stock center
CB-5615-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	34A8	Szeged stock center
CB-5096-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	34B12	Szeged stock center
CB-5312-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	34A5	Szeged stock center
CB-0522-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	34C6	Szeged stock center
5-HA-1183	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	33E3	Szeged stock center
5-HA-1140	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	33E1	Szeged stock center
5-SZ-3100	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	33E6	Szeged stock center
5-SZ-3324	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	34A4	Szeged stock center
5-SZ-3343	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	34B5	Szeged stock center
5-SZ-3970	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	34B5	Szeged stock center

Tab. M7 RS5- und RS3-P-Elemente in der *prd*-Region

RS5- und RS3-P-Elemente in der *en*-Region

Stock	Genotyp	Insertionsort	Referenz
CB-0438-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	48F5	Szeged stock center
CB-6523-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	48E4	Szeged stock center
CB-0666-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	48E4	Szeged stock center
CB-6286-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	48D1	Szeged stock center
CB-0208-3	<i>w;P{FRT,w+}RS3</i>	47F7	Szeged stock center
5-HA-1575	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	47F13	Szeged stock center
5-HA-1544	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	47F13	Szeged stock center
5-SZ-3621	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	49D3	Szeged stock center
5-SZ-3066	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	48C2	Szeged stock center
5-HA-1264	<i>w;P{FRT,w+}RS5</i>	48E3	Szeged stock center

Tab. M8 RS5- und RS3-P-Elemente in der *en*-Region

Transpositionen

Stock/Name	Genotyp	Bruchpunkte	Referenz
D258 Tp(2;3)prd5.12	<i>odd[III] dp prd[IIB] cn eve[ID]/ CyO; T(Y;2)prd[5.12] T(2;3)prd[5.12] T(2;3)prd[5.12], b,Adh[n2] pr cn sca</i> Männchen, die purpurfarbene Augen haben, produzieren die Defizienz	33A; 35B	Tübingen
88320 Tp(2;3)prd2.27	<i>CyO, Cy[1] dplv[1] pr[1] cn[2] ; Tp(2;3)prd2.27, b[1] pr[1] cn[1] sca[1]</i>	31B;33D;97C-D	Umea stockcenter
Tp(2;3)I.707	<i>w; Tp(2;3)I.707 + In(2L)Cy, Cy TE45F w[a]/ In(2L)Cy, (ap ast) b</i>	46D; 49E; 63AB	Ashburner

Tab. M9 Transpositionen

2.4.3 Das GAL4/UAS-System

Mithilfe des von Brand und Perrimon im Jahre 1993 entwickelten GAL4/UAS-Systems wurde eine zeitlich und räumlich beeinflussbare Genexpression möglich. Unter dem Einfluss zeit- und gewebespezifischer Enhancer wird in einem als 'Aktivator' bezeichneten Fliegenstamm der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert. In einem zweiten, 'Effektor' genannten Fliegenstamm steht das zu untersuchende Gen unter dem Einfluss von UAS-Sequenzen ('upstream activating sequences'), den Bindungsstellen für GAL4. Durch Kreuzung von 'Aktivator'- und 'Effektor'-Stamm gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur GAL4/UAS-vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Enhancer.

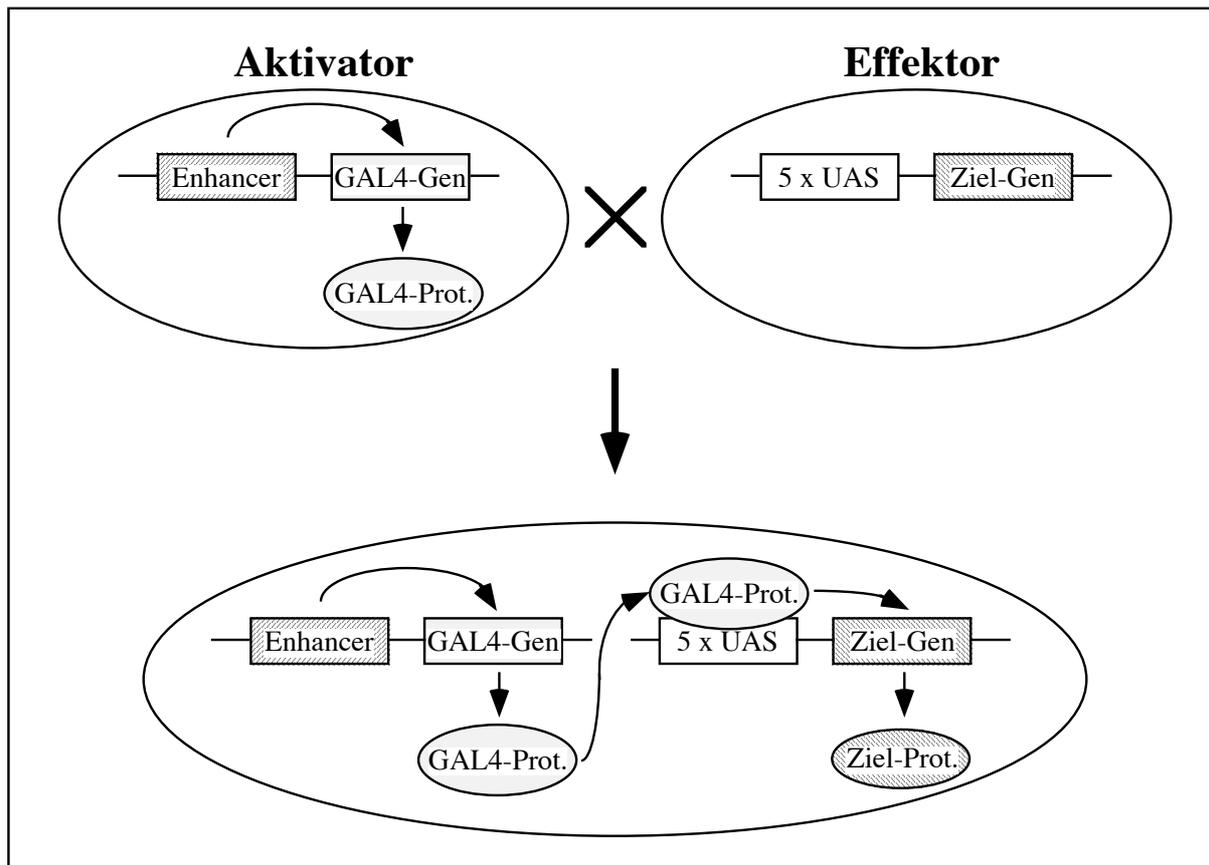


Abb. M1 Schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems

2.4.4 Erzeugung von synthetischen Deletionen

Um die zygotische Funktion von Genen während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* zu untersuchen, werden mit Hilfe von chromosomalen Compound-Chromosomen und Transpositionen Embryonen erzeugt, die für einen bestimmten Bereich des Genoms defizient sind. Diese Defizienzen werden als synthetische Deletionen bezeichnet.

Um synthetische Deletionen herzustellen, werden weibliche Compound-Fliegen mit männlichen Transpositions-Fliegen gekreuzt. 1/8 aller Embryonen aus diesen Kreuzungen tragen die Deletion. Die genotypische Bestimmung der Deletionsembryonen erfolgt über Antikörperfärbungen, die z. B. Segmentpolaritätsprodukte nachweisen (Gryzik und Müller, 2004; Müller et al., 1999).

2.4.5 FRT-vermittelte Rekombination

Die Methode der FRT-vermittelten Rekombination erlaubt es mit Hilfe von speziellen P-Elementen (P[RS5] und P[RS3], Golic und Golic, 1996) Deletionen mit molekular definierten Bruchpunkten herzustellen. Jedes dieser P-Elemente trägt ein funktionelles *white*-Gen, das im

1. Intron ein FRT besitzt. Zusätzlich besitzen die P-Elemente eine zweite FRT-Sequenz oberhalb (P[RS5]) oder unterhalb (P[RS3]) des *white*-Gens (vgl. Abb M2).

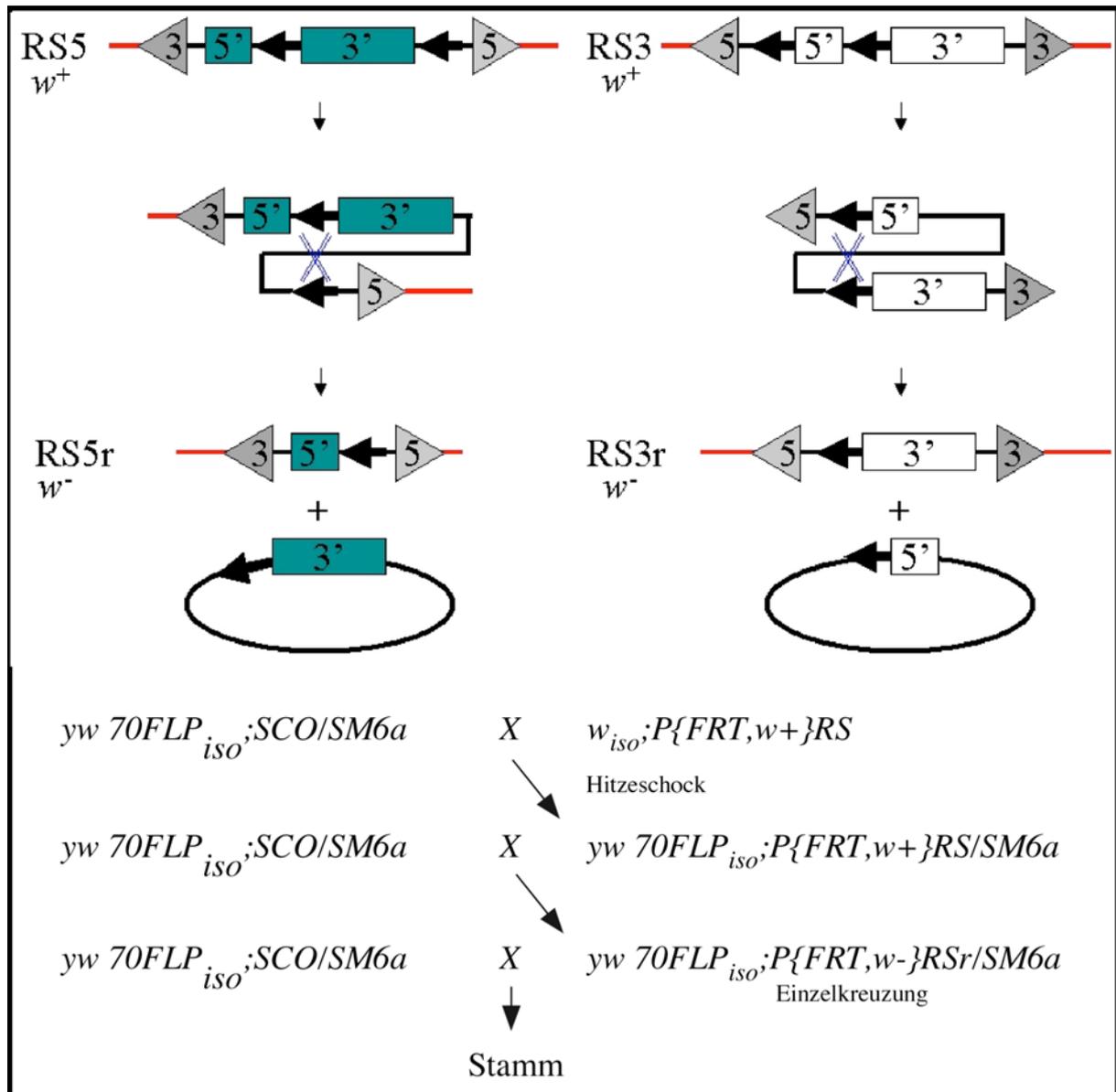


Abb. M2 Schematische Darstellung der Flipout-Rekombination und der hierfür notwendigen Kreuzungen
 Teile des *white*-Gens sind als grüne (P[RS5]) oder weiße Boxen (P[RS3]) dargestellt. FRT-Elemente sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und die Enden der P-Elemente als Dreiecke. Modifiziert nach www.drosdel.org.uk.

Der erste Schritt zur Erzeugung der Deletionen besteht darin, dass die FRT-flankierte Region aus den P-Elementen durch die Aktivierung einer Flipase entfernt wird (Flipout, Abb. M2). Dafür werden Fliegen, die das jeweilige P-Element tragen, mit Fliegen gekreuzt, die ein Flipase-Gen tragen. Die Aktivierung der Flipase in den Nachkommen durch einen Hitzeschock vermittelt die Exzision durch die Rekombination der FRT-Elemente. Die resultierenden P-Elemente (P[RS5r] und P[RS3r]) tragen nur noch Teile des *white*-Gens, das dadurch nicht mehr funktionell ist, und ein FRT-Element. Der zweite Schritt zur Erzeugung

von Deletionen beruht darauf, dass der Bereich zwischen zwei in *trans* auf homologen Chromosomen liegenden RSr-P-Elementen deletiert wird (Flipin, Abb. M3).

Dafür werden Fliegen, die ein RS3r-Element tragen, mit Fliegen gekreuzt, die ein RS5r-Element tragen. Die Aktivierung der Flipase in den Nachkommen durch einen Hitzeschock vermittelt die Rekombination der FRT-Elemente. Dieses Rekombinationsereignis führt dazu, dass das chromosomale Material zwischen den beiden RSr-Elementen deletiert wird. Das entstehende Deletionschromosom trägt zusätzlich ein wiederhergestelltes, funktionelles *white*-Gen, das von zwei 3'-P-Element-Enden flankiert wird.

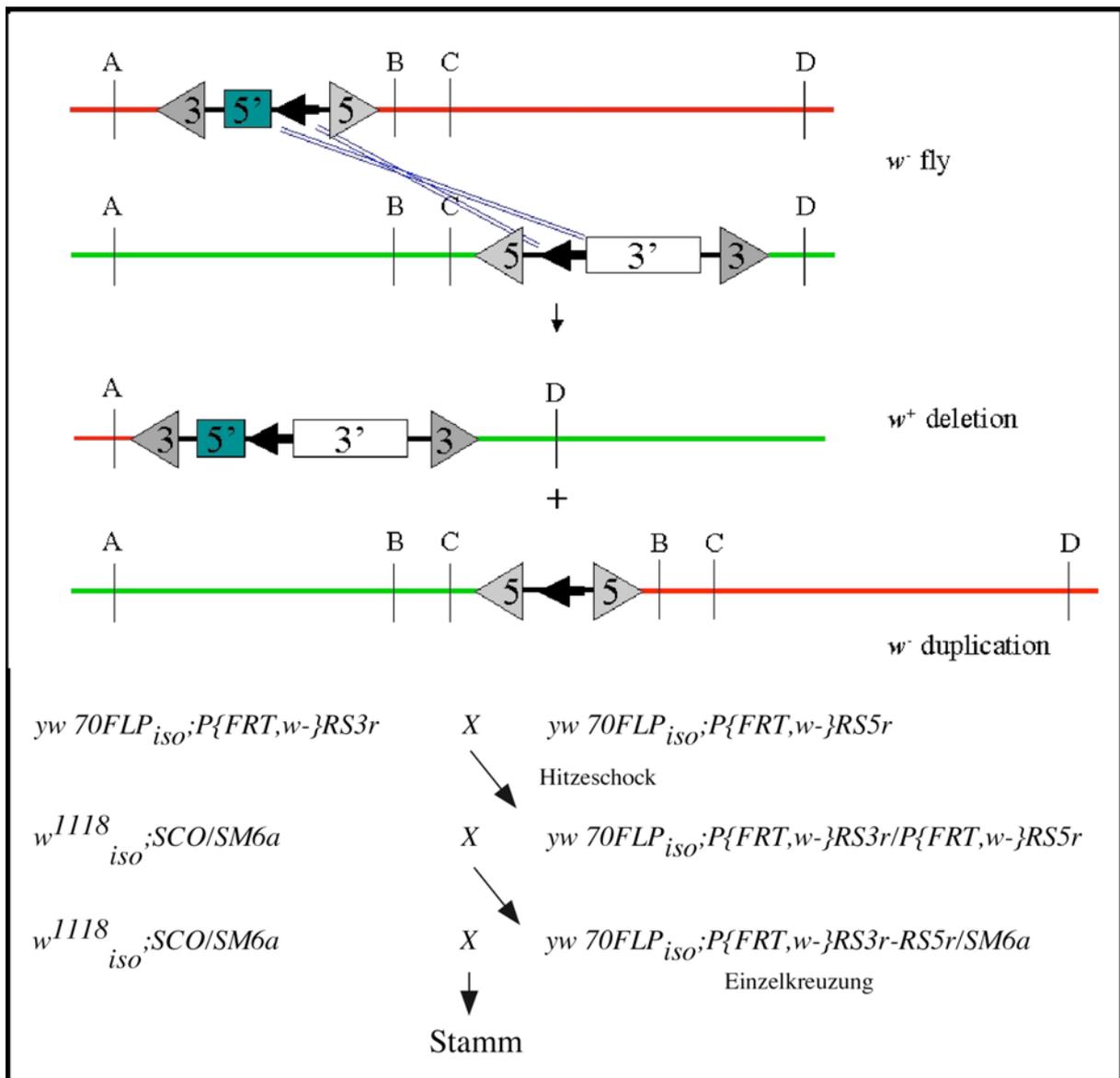


Abb. M3 Schematische Darstellung der Flipin-Rekombination und der hierfür notwendigen Kreuzungen
Abb. M3 Schematische Darstellung der Flipin-Rekombination und der hierfür notwendigen Kreuzungen
 Teile des *white*-Gens sind als grüne (P[RS5]) oder weiße Boxen (P[RS3]) dargestellt. FRT-Elemente sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und die Enden der P-Elemente als Dreiecke. Homologe Chromosomen sind als grüne und rote Striche dargestellt. Modifiziert nach www.drosdel.org.uk.

Die Herstellung einer Deletion in einer Fliege kann also durch die Expression des Selektionsmarker *white* detektiert werden.

Alle verfügbaren RS-P-Elemente (www.drosdel.org.uk) sind ansequenziert. Daher können durch eine passende Kombination von RS5- und RS3-Elementen gezielt Deletionen im gesamten Genom von *Drosophila* hergestellt werden.

2.4.6 Ungenaue P-Element-Exzision

Bei P-Elementen, die in der *Drosophila*-Genetik eingesetzt werden, wurde die Transposase-Funktion zerstört und durch einen Selektionsmarker ersetzt. Trotzdem können diese P-Elemente durch eine unabhängige Transposase-Quelle mobilisiert werden. Eine solche Mobilisierung führt in den meisten Fällen dazu, dass das P-Element vollständig aus dem ursprünglichen Insertionsort entfernt wird. In wenigen Fällen wird das P-Element ungenau aus dem Genom geschnitten, wobei ein Ende des P-Elements und der Selektionsmarker zerstört werden und oft flankierende DNA deletiert wird.

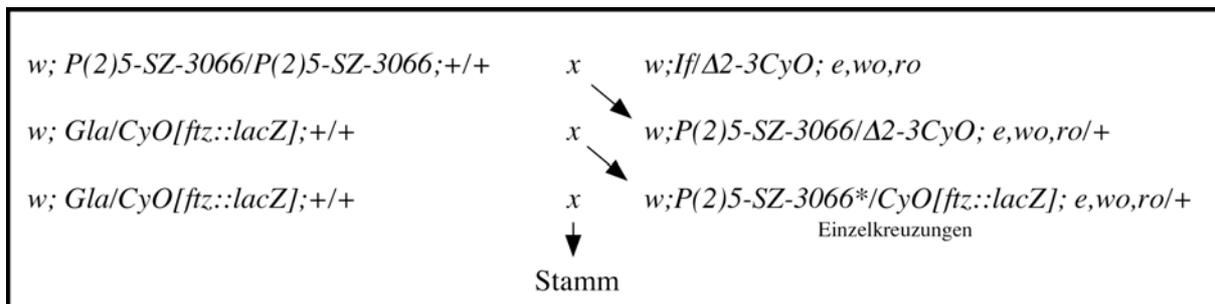


Abb. M4 Kreuzungsschemata für die Methode der ungenauen P-Element-Exzision

Insgesamt wurden 120 Linien etabliert. In zwei dieser Linien traten Nachkommen auf, die homozygot für das mutagenisierte P-Element-Chromosom waren und einen Flügeldefekt aufwiesen. Die chromosomalen Abberationen in diesen beiden Linien wurden durch PCR genauer charakterisiert.

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Mouse-a-β-Gal	1:1000	Promega
Rabbit-a-β-Gal	1:5000	Cappel
Rabbit-a-Twist	1:1000	S. Roth, Köln
Mouse-a-En/Inv	1:5	DSHB
Mouse-a-Nrt	1:10	DSHB
Mouse-a-dERK	1:100	Sigma
Mouse-a-Eve	1:50	DSHB
Mouse-a-CD2	1:1000	Serotec
Goat-a-mouse-AP	1:800	Dianova
Goat-a-rabbit-AP	1:800	Dianova
Goat-a-mouse-HRP	1:800	Dianova
Goat-a-rabbit-HRP	1:800	Dianova
Goat-a-rabbit-Cy2	1:200	Dianova
Goat-a-mouse-Cy3	1:200	Dianova

Tab. M4 Verwendete Antikörper

2.5.2 Antikörperfärbungen an Embryonen

2.5.2.1 Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper

- Embryonen dechorionisieren (ca. 3 min in Natriumhypochlorid), anschliessend gut mit H₂O waschen
- Embryonen im Szintillationsröhrchen mit 1:1 Fixierlösung/Heptan überführen und 20min auf dem Schaukler fixieren
- Embryonen devitellinisieren: wässriges Fixativ (untere Phase) abziehen, 4ml Methanol zugeben und 1min kräftig schütteln, Embryonen absinken lassen und Überstand abziehen
- Embryonen 3x kurz mit Methanol waschen
- Embryonen in Methanol bei -20°C lagern oder Methanol abziehen, durch 1xPBT ersetzen und 3 x 20min in 1xPBT waschen
- Embryonen 1h in 1xPBT + 10% NHS (Normal Horse Serum) blockieren
- Inkubation der Embryonen mit den ersten Antikörpern (in 1xPBT + 5% NHS) ü.N. bei 4°C
- erste Antikörper abziehen (mehrfach wiederverwendbar) und durch 1xPBT ersetzen
- 3 x 20min in 1xPBT waschen

- Inkubation der Embryonen mit den zweiten Antikörpern (in 1xPBT + 5% NHS) für 2h bei RT, anschliessend zweite Antikörper abziehen und durch 1xPBT ersetzen
- 3 x 20min in 1xPBT auf dem Taumler waschen
- Eindeckeln der Embryonen mit MOWIOL/DABCO

Lösungen:

Fixierlösung (10ml):	1,1 l 37% Formaldehyd, 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure 1,5 ml 0,5 M Pipes 5,9 ml dH ₂ O
PBT:	1 x PBS mit 0,1% Tween 20
PBS (10 x):	1,3 M NaCl; 70mM NaHPO ₄ ; 30 mM NaH ₂ PO ₄

2.5.2.2 Nachweis mit Enzym-gekoppelten Antikörper

Die ersten Schritte unterscheiden sich nicht von Antikörperfärbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und können daher unter 2.5.2.1 nachgelesen werden.

- Nach dem letzten Waschritt nach dem 2. Antikörper: Embryonen in Mikrotiterplatte überführen, 1xPBT durch DAB-Färbelösung ersetzen (optische Kontrolle der Färbereaktion unter dem Binokular)
- nach Beendigung der Färbereaktion Färbelösung abziehen und mehrfach mit 1xPBT waschen
- Embryonen 2 x 5 min mit AP-Puffer waschen
- Embryonen in Mikrotiterplatte überführen, AP-Puffer durch AP-Färbelösung ersetzen (optische Kontrolle der Färbereaktion unter dem Binokular)
- nach Beendigung der Färbereaktion Färbelösung abziehen und mehrfach mit 1xPBT waschen
- Alkoholreihe zum Entwässern der Embryonen: jeweils 5min in 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol, 2 x 10min in 100% Ethanol
- 2 x 5 min in Aceton waschen
- Inkubation in Araldit: Aceton (1:1) für 1 h auf den Taumler bei RT
- überführen der Embryonen in Araldit:Aceton auf einen Objektträger
- Orientierung der Embryonen mit Hilfe einer Präpariernadel
- Verdampfen des Acetons über Nacht im 65°C-Schrank
- Eindeckeln der Embryonen in 100% Araldit
- Aushärten des Araldits über Nacht im 65°-Schrank

Lösungen:

PBT:	1 x PBS mit 0,1% Tween 20
PBS (10 x):	1,3 M NaCl; 70mM NaHPO ₄ ; 30 mM NaH ₂ PO ₄
DAB-Färbelösung:	800µl 1xPBT + 200µl DAB-Stock (vorher aktiviert mit 1-2µl 3% H ₂ O ₂)
DAB-Stock:	1mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Aldrich, Steinheim) in 1xPBS, gelagert bei -20°C
AP-Puffer:	100mM Tris pH 9,5; 50mM MgCl ₂ ; 100mM NaCl; 0,1% Tween 20
AP-Färbelösung:	1ml AP-Puffer + 4,5µl NBT + 3,5 µl BCIP
Araldit (50 g) :	27,175 g Durcupan Komponente A/M 23,705 g Durcupan Komponente B Zusammen 1 Stunde über Kopf schütteln. Darauf dann: 1,75 g Durcupan Komponente C 1,00 g Durcupan Komponente D Zusammen nochmal e1 Stunde über Kopf schütteln.

2.5.3 Querschnitte von gefärbten Embryonen

2.5.3.1 Einbettung in Technovit

Embryonen, die mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt wurden, werden nach der Färbung (s. 2.5.2.1) weiterbehandelt, in Technovit eingebettet und dann geschnitten.

Nach dem letzten Waschritt:

- Nachfixierung: 4% FA in PBT für 20 min
- Waschen in PBT 3 x 10 min
- Entwässerung über EtOH-Reihe 30%, 50%, 70%, 96%, 100% jeweils 5 min
- Präinfiltration:
 - 1:1 Etoh: Technovit-Infiltrationslsg.(ohne Starter) für 30 min RT auf dem Schüttler
 - 100% Infiltrationslsg.(ohne Starter) für 30 min RT auf dem Schüttler
 - 100% Infiltrationslsg.(ohne Starter) ü.N. 4°C auf dem Schüttler
- Vorbereitungen für die Einbettung treffen

Vorbereitungen zur Einbettungen

- Weiße Förmchen mit Metallbügeln bestücken.
- Pro Einbettungskammer 1,5 ml Infiltrationslösung (mit Starter) einfüllen
- Auf 1 ml Infiltrationslsg.(4°C) kommen 66µl Starter (RT)
- Lösung zügig einfüllen, damit sie nicht schon vorher polymerisiert.
- Über Nacht auspolymerisieren bei RT lassen, vor Staub schützen.

Einbettungen in Technovit

- Parafilm-Stücke ausschneiden, die das ganze Förmchen bedecken.

- Embryonen mit abgeschnittener gelber Spitze in die vorpolymerisierten Förmchen überführen. (jedes Stadium ein eigenes Förmchen).
- Embryonen nebeneinander in der Form orientieren. Möglichst nah am Rand und zentriert
- Für jede Form einzeln 2,5 ml Infiltrationslösung mit Starter (66µl/ml) vorbereiten. (Nicht für jede Form gleichzeitig, weil es schnell anfängt zu polymerisieren.)
- Die 2,5 ml Infiltrationslsg plus Starter langsam in das Förmchen fließen lassen.
- Das sollte von der Seite aus geschehen, wo sich der Metallbügel befindet, damit sich die Embryonen nicht mehr verschieben.
- Unverzüglich das Förmchen mit einem Stück Parafilm abdecken.
- Neue 2,5 ml Infiltrationslsg. ansetzen und das Einbetten wiederholen.
- Wenn alle Embryonen eingebettet sind, das ganze ü. N. auf 4°C stellen.
- Am nächsten das Technovit-Blöckchen mit Hilfe einer Zange und dem Metallbügel aus der Form holen und in eine Trocknungskiste überführen. Die Kiste bleibt auf 4°C bis das Technovit geschnitten wird.

Die Technovit-Blöckchen werden mit einem Reichert Jung-Microtom geschnitten. Die 7µm dünnen Schnitte werden anschließend für 20 min in 50mM DABCO in PBS inkubiert und dann in MOWIOL/DABCO eingedeckelt.

2.5.3.2 Einbettung in Araldit

Embryonen, die mit Enzym-gekoppelten Antikörpern gefärbt wurden, werden nach der Färbung (s. 2.5.2.1) in Araldit eingebettet und dann geschnitten

Nach der Inkubation in 1:1 Araldit : Aceton:

- Aceton unter dem Abzug verdampfen lassen (15 min)
- Förmchen mit Araldit befüllen, dann Embryonen mit der Pipette überführen.
- Förmchen ü. N. auf 65°C aushärten lassen.

Die Araldit-Blöckchen werden mit einem Reichert-Microtom OmU2 geschnitten. Die 5µm dünnen Schnitte werden dann in Araldit eingedeckelt.

2.5.4 in situ-Hybridisierung an Embryonen

DIG-markierte RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription mithilfe des DIG RNA Labeling Mix von *Roche Diagnostics*, Mannheim, nach Angaben des Herstellers gewonnen. Qualität und Quantität der RNA-Sonden wurden durch denaturierende Gelelektrophorese ermittelt.

- Embryonen gewünschten Alters in einem Gemisch aus Natriumhypochlorid und H₂O (1:1) ca. 4min dechlorionisieren und mehrmals mit dH₂O spülen
- Embryonen in 4.25ml PBS, 750µl 37% Formaldehyd, 5ml Heptan im Szintillationsröhrchen für 25min auf dem Schüttler fixieren; untere Fixativ-Phase abziehen, 5ml Methanol zugeben und 1min kräftig schütteln/vortexen; devitellinisierte Embryonen sinken herab, Überstand komplett abziehen, Embryonen zweimal mit Methanol waschen und in Eppendorf-Gefäße überführen; anschliessend zweimal mit Ethanol waschen und bis zur Verwendung bei -20°C lagern
- Embryonen in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Ethanol für 30min inkubieren
- 5 x kurz mit Ethanol, 2 x kurz mit Methanol, 3 x kurz mit 1xPBT waschen
- 25min in 1xPBS + 5% Formaldehyd fixieren
- 5 x kurz mit 1xPBT waschen
- 8min in 1xPBT + 4µg/ml Proteinase K inkubieren
- 4 x kurz mit 1xPBT waschen
- 25min in 1xPBS + 5% Formaldehyd nachfixieren
- 5 x kurz mit 1xPBT waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung inkubieren
- 3 x kurz mit Hybridisierlösung waschen
- mindestens 1h in Hybridisierlösung bei 68°C vorhybridisieren
- Überstand abziehen und 100µl Hybridisierlösung + 1-2µl RNA-Sonde (5min in Hybridisierlösung auf 65°C erwärmt und auf Eis abgekühlt) zugeben
- ü.N. bei 68°C hybridisieren
- 4 x 20min in Hybridisierlösung bei 68°C waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung waschen
- 4 x 15min mit 1xPBT waschen
- 1h mit präadsorbiertem -DIG-Antikörper (1:2000, verdünnt in 1xPBT) inkubieren
- 4 x 15min mit 1xPBT waschen
- 3 x 5min mit NBT-Puffer waschen

- Färbereaktion durchführen, Embryonen entwässern und Dauerpräparat anfertigen

Lösungen:

Hybridisier-Lsg.: 50% deionisiertes Formamid, 5xSSC, 100µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 100µg/ml Heparin, 0.1% Triton X-100
NBT-Puffer: 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Triton X-100
NBT: 75mg/ml Nitroblau-Tetrazolium-Salz in DMF
BCIP: 50mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat, Toluidin-Salz in DMF

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Erzeugung von FGF8-like1- und FGF8-like2-spezifischen Antikörpern

Um die Lokalisation von FGF8-like1 und FGF8-like2 in *whole mount*-Antikörperfärbungen untersuchen zu können, wurde die Herstellung von Antikörpern initiiert. Auf der Basis ihrer jeweiligen Aminosäuresequenz wurden durch die Firma *Eurogentec*, Seraing, Belgien, zwei Peptide à 16 Aminosäuren synthetisiert (EP040173 (FGF8-like2) : H₂N-SQRLQQD-EQHPQNEY-CONH₂, und EP040174 (FGF8-like1): H₂N-CNISNKSSSSTKATPT-CONH₂), an Trägermoleküle gekoppelt und jeweils gemeinsam zur Immunisierung zweier Kaninchen eingesetzt.

2.6.2 Herstellung von Embryonenextrakten

- Embryonen von 4-5 ü.N.-Ablagen sammeln, dechorionisieren und waschen
- je ca. 100µl Embryonen mit 1ml Lysis-Puffer versetzen
- auf Eis homogenisieren (Bio-Votexer, *Biospec Products*, Bartlesville, USA)
- 30min auf Eis inkubieren
- 10min bei 13000rpm, 4°C, zentrifugieren
- Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- 1h bei 13000rpm, 4°C, zentrifugieren
- Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- Proteinbestimmung wie folgt durchführen: 800µl H₂O + 200µl RotiQuant (*Roth*, Karlsruhe) + 2µl Embryonenlysat mischen und OD₅₉₅ bestimmen; OD₅₉₅ = 1 entspricht ca. 1mg/ml Gesamtprotein
- Embryonenlysat bei -70°C lagern

Lösungen:

Lysis-Puffer: 150mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 1% Triton X-100, inklusive folgenden Protease-Inhibitoren: Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc (je 2µg/ml)

2.6.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blot

Für SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting wurde ein kombiniertes Gelelektrophorese-/Nassblotgerät der Firma *Biorad*, München ('Mini Trans-blot'), gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Proteine wurden in 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, im Western-blot auf Nitrozellulosemembranen (*Schleicher und Schüll*, Dassel) übertragen und der Transfer durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Bei der Proteindetektion wurde weiterhin wie folgt vorgegangen:

- Nitrozellulosemembran für 1h in Blockierlösung inkubieren
- Inkubation mit dem entsprechend verdünnten ersten Antikörper in Blockierlösung (möglichst kleines Volumen, 3-5ml) ü.N. bei 4°C auf dem Taumler
- 4 x 15min in 1xTBST waschen
- Inkubation mit dem 1:5000-1:10000 verdünnten zweiten Antikörper (HRP-gekoppelt) in Blockierlösung für 2h bei RT auf dem Taumler
- 4 x 15min in 1xTBST waschen
- Detektion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim) nach Herstellerangaben

Lösungen:

Trenngel (10%): 2.5ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 2.8ml 1M Tris pH 8.8, 38µl 20% SDS, 2.1ml H₂O, 30µl 10% APS, 8µl TEMED

Sammelgel: 310µl 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 235µl 1M Tris pH 6.8, 10µl 20% SDS, 1.3ml H₂O, 10µl 10% APS, 5µl TEMED

1xTBST: 50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween

Blockierlsg.: 3% Milchpulver, 1% BSA in 1xTBST

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer zygotischer Gene mittels synthetischer Defizienzen

Der Prozess der Mesodermwanderung in *Drosophila* wird durch die Aktivität des FGF-Rezeptors Heartless (Htl) kontrolliert. Obwohl einige Moleküle des Htl-Signalweges (MAP-Kinase-Kaskade) bekannt sind, war unklar, welches Protein für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich ist und wie dieses Signal zu Veränderungen im Zellverhalten führt.

Um fehlende Komponenten für die Regulation der Mesodermwanderung zu finden, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. In diesem Ansatz werden aneuploide Embryonen erzeugt, die große chromosomale Deletionen, so genannte synthetische Deletionen, tragen. Diese synthetische Deletionen decken zusammen 99,7 % des *Drosophila*-Genoms ab. Synthetischen Deletionen werden durch eine Kombination von Compound-Chromosomen und Transpositionen erzeugt und beeinträchtigen nicht die maternale Gendosis im Embryo (Müller et al., 1999). Damit ist dieser genetische Ansatz gut geeignet, um Gene mit einer frühen zygotischen Funktion zu identifizieren.

Die Mesodermmorphogenese in den aneuploiden Embryonen wurde immunohistochemisch untersucht. Als immunologischer Marker wurde ein Antikörper gegen das Mesoderm-spezifische Kernprotein Twist (Twi) verwendet. Anhand der Twi-Markierung ist es möglich, Defekte während der Mesodermzellwanderung aufzudecken. Gleichzeitig erfolgte zur Genotypisierung der Defizienz-Embryonen eine Immunmarkierung mit Antikörpern gegen das Engrailed(En)-Protein. Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die meisten synthetischen Defizienzen Gene deletieren, die für die Musterbildung des Embryos notwendig sind. Diese Defekte in der Musterbildung beeinflussen unter anderem die Expression von *en* (vgl. Abb1). Mit dieser Methode wurden sieben genomische Regionen identifiziert, die für die Mesodermwanderung notwendig sind. Darunter wurden auch Gene gefunden (*htl* und *dof*), von denen schon bekannt war, dass sie eine Funktion während der Mesodermmigration ausüben (Gryzik und Müller, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei genomische Bereiche mit dem Ziel ausgewählt, die für die Mesodermwanderungsdefekte verantwortlichen Gene zu kartieren und molekular zu charakterisieren. Die Angaben zur Lokalisation dieser beiden Regionen beruhen auf einer zytologischen Karte, die das Bandenmusters der Polytänochrosomen widerspiegelt. Die erste Region erstreckt sich über den Bereich der zytologischen Position 33A bis 35B auf dem

linken Arm des 2. Chromosoms und wird durch die Transposition *Tp(Y;2)prd5.12* abgedeckt. Im Folgenden wird dieser Bereich als *prd*-Region bezeichnet, da er den *paired(prd)*-Locus einschließt. Die zweite Region wird durch die Transposition *Tp(2;3)I.707* abgedeckt und erstreckt sich von der zytologischen Position 46A bis Position 50A auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms. Dieser Bereich wird nachfolgend als *en*-Region bezeichnet, da er den *engrailed(en)*-Locus beinhaltet.

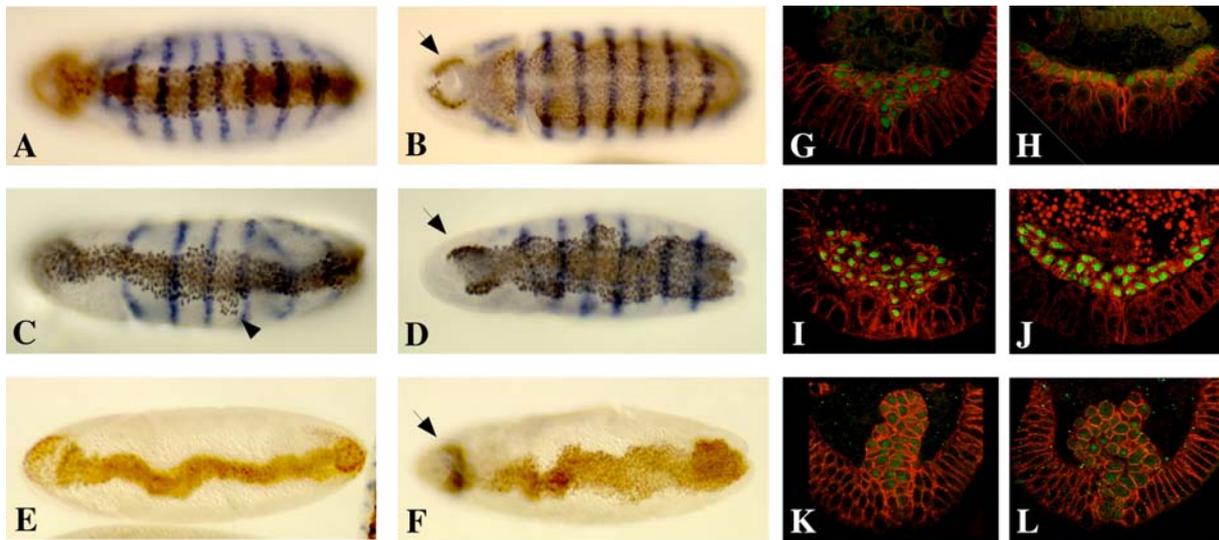


Abb.1 Mesodermwanderungsdefekte in Embryonen, die synthetische Deletionen tragen

(A-F) Ventrale Ansicht auf Embryonen gefärbt mit Antikörpern gegen das Twist-Protein (braun) und gegen das Engrailed-Protein (blau). In Wildtyp-Embryonen wird während der Gastrulation ([A]; Stadium 8) und der Keimbandausstreckung ([B]; Stadium 10) das En-Protein in 14 parasegmentalen Streifen exprimiert. ([C]; Stadium 8 und [D]; Stadium 10) In aneuploiden Embryonen, in denen der Bereich der Transposition *Tp(Y;2)prd5.12* deletiert ist, werden nur 7 En-Streifen detektiert, da die Funktion des Paarregelgens *prd* ausgeschaltet ist. ([E]; Stadium 8 und [F]; Stadium 10) In aneuploiden Embryonen, die für den Bereich der Transposition *Tp(2;3)I.707* deletiert sind, sind die En-Streifen nicht detektierbar, da der *en*-Lokus innerhalb der Transposition liegt. (G-L) Konfokale Aufnahmen von Embryoquerschnitten. Embryonen sind mit Antikörpern gegen das Twist-Protein (grün) und gegen das Membranprotein Neurotactin (rot) zur Darstellung der Zellumrisse gefärbt. ([G; Stadium 8] und [H; Stadium 9]) Wildtyp-Embryonen. ([I; Stadium 8] und [J; Stadium 9]) Synthetische Deletion *Tp(Y;2)prd5.12*. ([K; Stadium 8] und [L; Stadium 9]) Synthetische Deletion *Tp(2;3)I.707*. Pfeile markieren das Kopfmesoderm und Pfeilköpfe heben einzelne Mesodermzellen hervor. Da aneuploide Embryonen durch die großen synthetischen Deletionen viele Defekte aufweisen, wird die Umorganisation des Kopfmesoderms in diesen Embryonen als Marker für das Entwicklungsstadium genutzt.

Die weitere Arbeit fokussierte sich auf diese beiden Bereiche, da mutante Embryonen mit den korrespondierenden synthetischen Deletionen besonders starke Defekte in der Mesodermwanderung ausprägen. Die Phänotypen dieser Embryonen sind in Abbildung 1 dargestellt.

In Wildtyp-Embryonen ist in Stadium 8 der Prozess der Invagination des Mesoderms abgeschlossen und nach einer Reihe von mitotischen Teilungen beginnen die Mesodermzellen in dorso-lateraler Richtung zu wandern. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Mesodermzellen als Aggregat auf dem ventralen Ektoderm (Abb.1A und G). Bis zum frühen Stadium 10 haben sich die Zellen auf dem Ektoderm ausgebreitet und liegen als

einschichtiges Gewebe vor, das im Bereich der ventralen Mittellinie voneinander getrennt ist (Abb.1B und H). Zu diesem Zeitpunkt hat sich auch das Kopfmesoderm in zwei bilateral-symmetrische Platten organisiert (Abb.1B, Pfeil) (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Bereits in Stadium 8 weisen Embryonen, die defizient für die *prd*-Region sind, Mesodermwanderungsdefekte auf. Die Mesodermzellen befinden sich nicht im geordneten Verband längs der ventralen Mittellinie, sondern sind ungleichmäßig auf dem Ektoderm verteilt. Einzelne Zellen haben sich aus dem Verband gelöst und liegen abseits (Abb.1C, Pfeilkopf). In Querschnitten von mutanten Embryonen dieses Stadiums wird ebenfalls deutlich, dass das Mesoderm nicht gleichmäßig auf beide Seiten des Ektoderms verteilt ist. Zusätzlich scheint der Kontakt zwischen Ektoderm und Mesoderm gestört zu sein (Abb.1I). Im frühen Stadium 10 ist erkennbar, dass der Wanderungsprozess der Zellen gestört ist. Es hat zwar eine Ausbreitung stattgefunden, aber diese ist nicht vollständig und nur unregelmäßig erfolgt, so dass das Mesoderm kein einschichtiges Gewebe bildet (Abb.1D und J).

Embryonen, die defizient für die *en*-Region sind, zeigen einen noch stärkeren Phänotyp. Nach der Invagination lösen sich die Zellen nicht aus dem Zellverband und sind daher nicht in der Lage das Ektoderm zu berühren. Sie bilden ein kompaktes Zellaggregat, das sich in das Innere des Embryos erstreckt (Abb.1E und K). In späteren Stadien haben manche Zellen Kontakt zum Mesoderm, aber eine normale Ausbreitung findet nicht statt (Abb.1F und L). Zusätzlich ist in diesen Embryonen auch die Ausbildung des Kopfmesoderms gestört. Da es aber in zwei Komponenten organisiert ist, ist eine ungefähre Zuordnung des Entwicklungsstadiums möglich (Abb.1F, Pfeil).

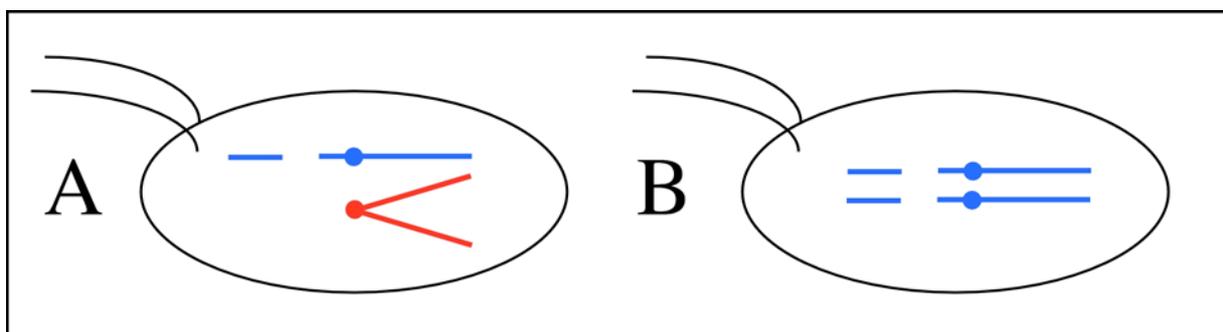


Abb.2 Unterschiede im Genotyp von synthetischen Deletionen und Transpositionsdeletionen

Compoundchromosomen sind in rot dargestellt und Transpositionschromosomen in blau. [A] Schematische Darstellung eines Embryos, der eine synthetische Defizienz auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms trägt. [B] Schematische Darstellung eines Embryos, der durch die Kombination zweier Transpositionschromosomen für den Bereich der Transposition deletiert ist.

Synthetische Defizienzen entstehen durch die Kombination von Compound-Chromosomen und verschiedenen Transpositionen. Embryonen, die eine synthetische Deletion auf dem 2. Chromosom tragen, sind in Bezug auf einen Chromosomenarm triploid, während der andere Chromosomenarm haploid vorliegt und zusätzlich die Deletion im Bereich der Transposition trägt (Abb.2A). Um mögliche Effekte dieser Aneuploidie auf die Mesodermmorphogenese zu untersuchen, wurden Embryonen erzeugt, in denen nur der Bereich der Transposition homozygot deletiert ist, die ansonsten aber eine diploide Gendosis zweitchromosomaler Gene besitzen (im Folgenden als Transpositionsdeletion bezeichnet, Abb.2B). Der Phänotyp dieser Embryonen wurde dann in Bezug auf Mesodermwanderungsdefekte mit dem Phänotyp der aneuploiden Embryonen verglichen.

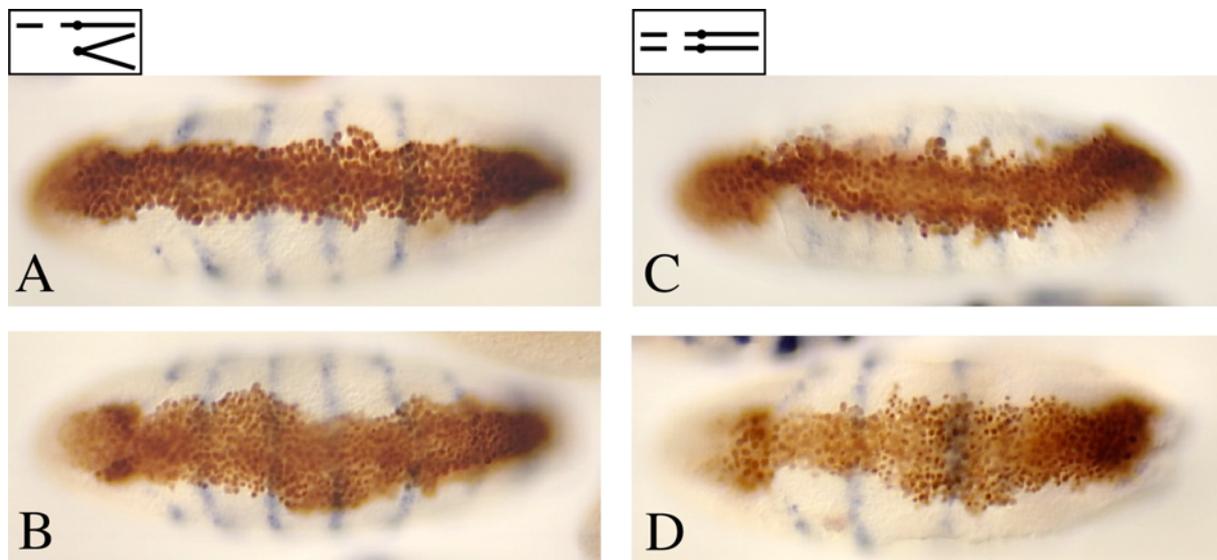


Abb.3 Vergleich der synthetischen Deletion $Tp(Y;2)prd5.12$ mit der Transpositionsdeletion von $Tp(Y;2)prd5.12$

Ventrale Ansicht auf Embryonen gefärbt mit Antikörpern gegen das Twi-Protein (braun) und das En-Protein (blau). ([A, Stadium 8] und [B, Stadium 9]) Aneuploide Embryonen, die die synthetische Deletion $Tp(Y;2)prd5.12$ tragen. ([C, Stadium 8] und [D, Stadium 9]) Embryonen, die die Transpositionsdeletion $Tp(Y;2)prd5.12$ tragen.

Im Falle der *prd*-Region konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb.3). Ein Einfluss der Aneuploidie auf die Defekte konnte dadurch ausgeschlossen werden. Anders verhält es sich im Fall der *en*-Region. Beim Vergleich der aneuploiden Embryonen mit Embryonen, die nur die Deletion tragen, wird deutlich, dass der Mesodermphänotyp abgeschwächt wird, wenn keine Aneuploidie vorliegt (Abb.4). In diesen Deletionsembryonen sind in frühen Stadien Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Mesodermzellen erkennbar, die aber weniger stark ausgeprägt sind als in aneuploiden Embryonen (Abb.4A und D). In späteren Stadien hat eine unvollständige Ausbreitung stattgefunden. Obwohl die Aneuploidie einen Einfluß auf den

Phänotyp nimmt, resultiert ein Mesodermwanderungsdefekt auch aus der Deletion des Transpositionsbereiches.

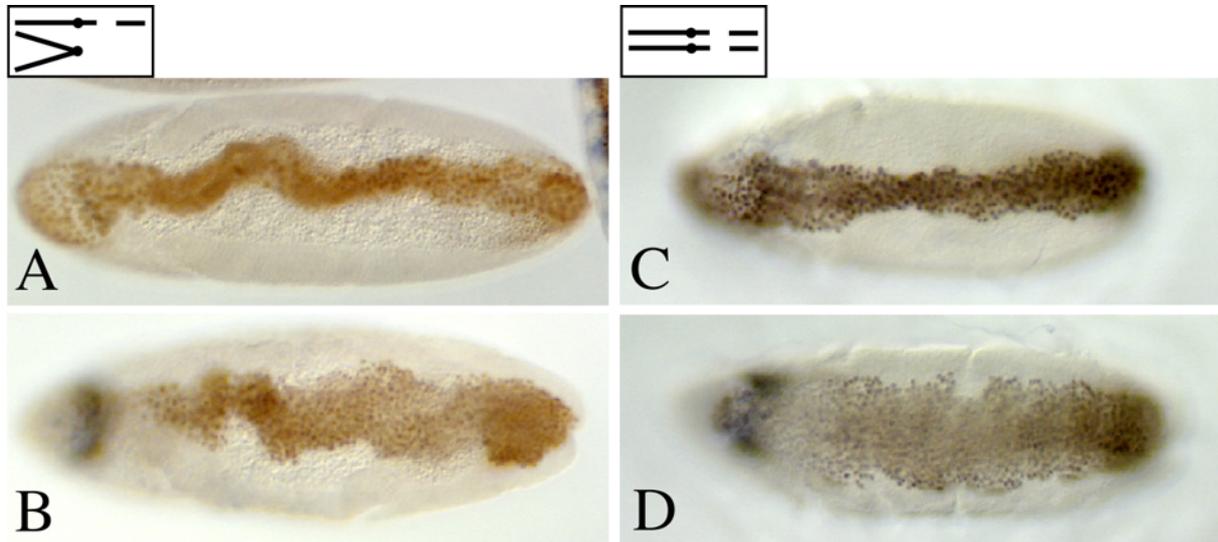


Abb.4 Vergleich der synthetischen Defizienz $Tp(2;3)I.707$ mit der Transpositionsdeletion von $Tp(2;3)I.707$
 Ventrale Ansicht auf Embryonen gefärbt mit Antikörpern gegen das Twi-Protein (braun). ([A, Stadium8] und [B, Stadium 9]) Aneuploide Embryonen, die die synthetische Deletion $Tp(2;3)I.707$ tragen. ([C, Stadium8] und [D, Stadium 9]) Embryonen, die die Transpositionsdeletion $Tp(2;3)I.707$ tragen.

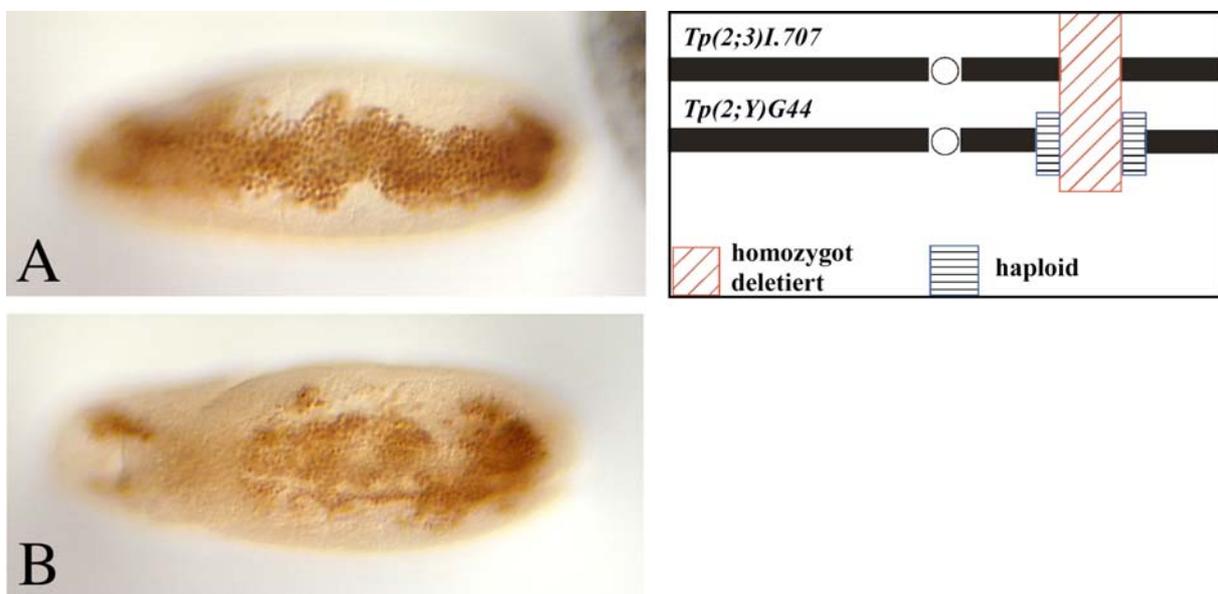


Abb.5 Der stärkere Mesodermwanderungsdefekt wird durch einen in Haploidie vorliegenden Lokus verursacht

Ventrale Aufsicht auf Embryonen, die die Transposition $Tp(2;3)I.707$ in trans zur Transposition $Tp(2;Y)G44$ tragen und mit einem Antikörper gegen das Twist-Protein (braun) gefärbt sind. Sowohl in Stadium 9 (A) also auch in Stadium 10 (B) phänotypieren die Embryonen den Wanderungsdefekt der synthetischen Deletion (vgl. Abb.4B und C). Dieses kann durch das zusätzliche Auftreten zweier haploider Bereiche erklärt werden (Schema).

Durch Kreuzungsexperimente konnte die Frage geklärt werden, welcher der Aneuploidie-Effekte (Haploidie oder Triploidie) Einfluß auf die Mesodermmorphogenese nimmt. Wenn die Transposition $Tp(2;3)I.707$ in trans zu der Transposition $Tp(2;Y)G44$ vorliegt, prägen diese Embryonen in Bezug auf die Mesodermwanderung den gleichen Phänotyp aus wie die aneuploiden Embryonen (Abb.5 A und B). Da die Transposition $Tp(2;Y)G44$ eine Region abdeckt, die zusätzlich zur *en*-Region auch noch distale und proximale Bereiche deletiert, ist eine Verstärkung des Phänotyps auf diese haploid vorliegenden Regionen zurückzuführen (Abb.5 Schema). Eine genauere Kartierung des haploiden Locus wurde nicht durchgeführt.

In beiden Fällen (*prd*- und *en*-Region) liegt unabhängig von der Aneuploidie ein Mesodermwanderungsdefekt vor. Beide Bereiche enthalten also zygotische Gene, die für den Prozess der Mesodermwanderung essentiell sind.

3.2 Kartierung der genomischen Bereiche

3.2.1 Deletionskartierung

Mit Hilfe von kleineren, miteinander überlappenden chromosomalen Deletionen kann der genomische Bereich, in dem sich die gesuchten Gene befinden, weiter eingeschränkt werden. Zu diesem Zweck wurden alle verfügbaren Deletionen der *prd*- und *en*-Region mit Hilfe von Antikörperfärbungen gegen das Twist-Protein auf Defekte in der Mesodermmorphogenese untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass im Falle beider Regionen keine der verfügbaren Deletionen den Phänotyp der jeweiligen Transposition widerspiegelt. Dabei gilt es zu beachten, dass bestimmte Bereiche der Transpositionen nicht vollständig durch Deletionen abgedeckt werden (Abb.6 und 7).

Verschiedene Hypothesen können erklären, warum die starken Defekte der synthetischen Defizienzen in den konventionellen Deletionen nicht detektiert werden konnten: [1] Unter der Voraussetzung, dass der beobachtete Phänotyp aus dem Verlust eines einzelnen Gens resultiert, liegt dieses gesuchte Gen in den Bereichen, die nicht durch eine Deletion abgedeckt werden. [2] Falls der Phänotyp durch den Verlust von zwei oder mehreren Genen, die weit voneinander entfernt liegen, verursacht wird, prägen sich die Defekte nur in der synthetischen Defizienz aus. Der Verlust einzelner Gene durch kleine Deletionen führt dann zu keinem Mesodermwanderungsdefekt.

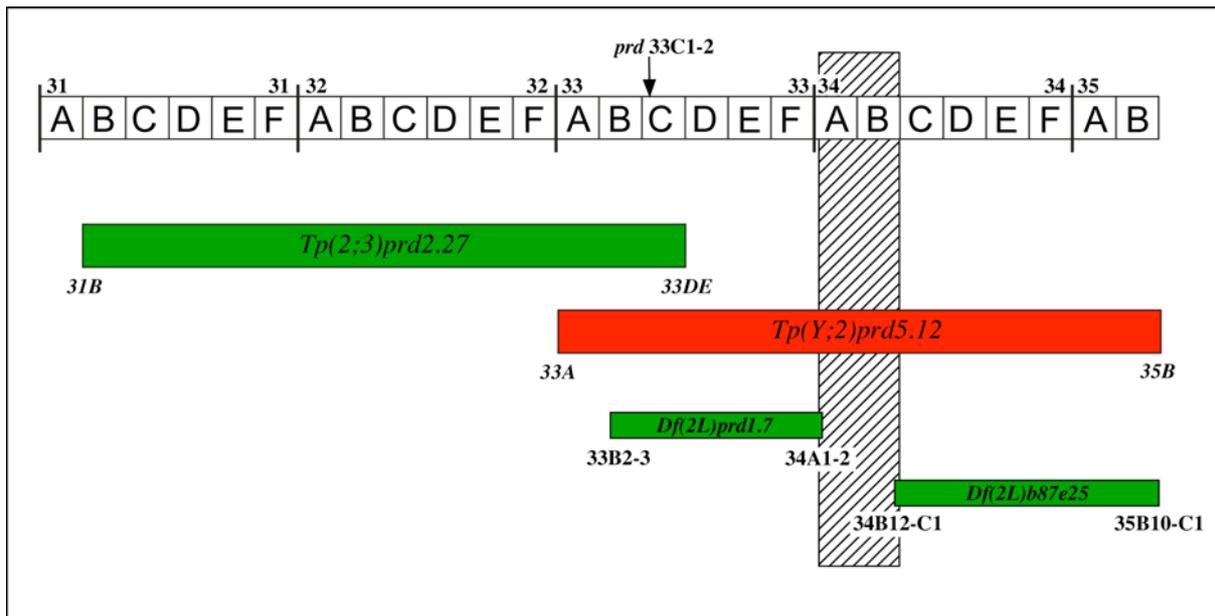


Abb.6 Deletionskartierung im Bereich der Transposition $Tp(Y;2)prd5.12$ Legende s. Abb.6

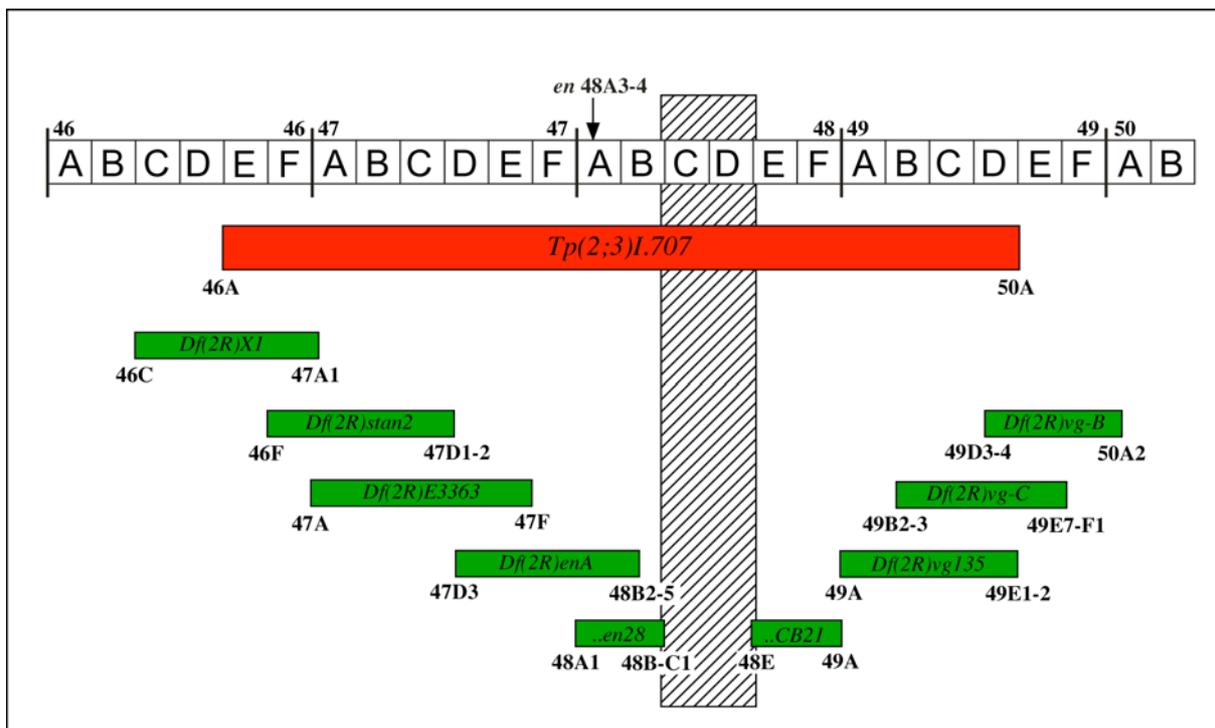


Abb. 7 Deletionskartierung im Bereich der Transposition $Tp(2;3)I.707$

Die zytologische Skala der Chromosomenbänder ist vereinfacht dargestellt. Die Größe der Transpositionen und Deletionen ist dieser Skala angepasst. Transpositionen sind durch Tp, Deletionen durch Df abgekürzt. Eine Rotfärbung der Balken zeigt das Vorhandensein des Mesodermwanderungsphänotyps an, wenn dieser Bereich homozygot deletiert ist. Eine Grünfärbung der Balken bedeutet, dass dieser Phänotyp nicht detektiert werden konnte. Schraffierte Bereiche stellen Regionen dar, für die zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine überlappenden Deletionen verfügbar waren. Die Überlappung der vorhandenen Deletionen wurde genetisch durch Komplementationskreuzungen sichergestellt.

Beide Hypothesen können nur bestätigt oder widerlegt werden, wenn Deletionen zur Verfügung stehen, welche die Lücke zwischen den vorhandenen Deletionen schließen. Das nächste Ziel war die Generierung von neuen Deletionen, die diese Voraussetzung erfüllen.

3.2.2 Erzeugung neuer Deletionen durch Röntgenbestrahlung und „male recombination“

Mit der Herstellung von Deletionen wurde schon in der Diplomarbeit begonnen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Ansätzen versucht, Deletionen in den unabgedeckten Bereichen zu erzeugen. Der erste Ansatz beruhte auf der Methode der Röntgenbestrahlung. Bei der zweiten Methode handelte es sich um einen genetischen Ansatz, die „Rekombination in Männchen“ („male recombination“, Preston et al., 1996). Diese Methoden werden häufig angewendet, um Deletionen in *Drosophila* zu erzeugen. Beide Ansätze lieferten keine Deletionen, die den Bereich der Lücke überlappend abdeckten oder den Mesodermwanderungsdefekt ausprägten. Alle Informationen zu diesen Experimenten sind in der Diplomarbeit zusammengefasst (Gryzik, 2000).

3.2.3 Erzeugung neuer Deletionen durch FRT-vermittelte Rekombination

Das Genom von *Drosophila melanogaster* konnte zu Beginn dieser Arbeit nur zu ca. 70% durch Deletionen abgedeckt werden. Die Methode der „FRT-vermittelten Rekombination“ (Golic und Golic, 1996) erlaubt es theoretisch, in kurzer Zeit molekular charakterisierte Deletionen im gesamten Bereich des Genoms herzustellen (Ryder, 2004). Diese Methode beruht darauf, dass zwei Konstrukte mit FRT (Flipase recombination targets)-Sequenzen, in Anwesenheit einer Flipase miteinander rekombinieren. Wenn diese FRT-Insertionen in *trans* benachbart auf homologen Chromosomen liegen, wird durch die Rekombination der zwischen den Insertionen liegenden genomischen Bereich deletiert (Abb.8).

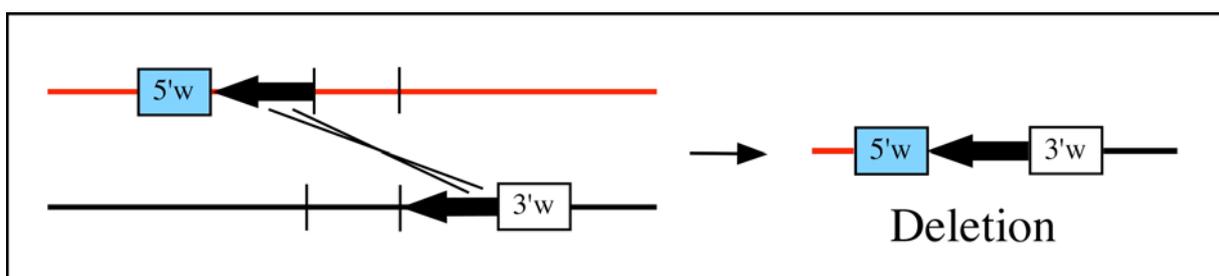


Abb.8 Schematische Darstellung der „FRT-vermittelten Rekombination“

FRT-Sequenzen sind als Pfeile dargestellt und können in Anwesenheit der Flipase miteinander rekombinieren (angedeutet durch die gekreuzten Linien), wodurch der 5'-Teil des Selektionsmarkers *white* (5'w, blaue Box) mit dem 3'-Teil des entsprechenden Gens (3'w, weiße Box) kombiniert wird.

Die FRT-Konstrukte beinhalten neben den FRT-Sequenzen jeweils auch einen Genabschnitt des Selektionsmarkers *white* (*w*). Durch das Rekombinationsereignis werden diese beiden Teile zusammengebracht und das Markergen kann exprimiert werden. Ein Tier, das die Deletion trägt, kann daher anhand der Expression des Markergens selektioniert werden. Da

die exakte Lokalisation der FRT-Konstrukte durch Sequenzierungen bekannt ist, ist die Größe der entstehenden Deletion molekular festgelegt. Im Rahmen eines EU-Konsortiums (Drosdel = **Drosophila Deletion Project**) wurden und werden viele FRT-Konstrukte mit Hilfe von P-Elementen in das Genom von *Drosophila* inseriert. Eine einfache Software (www.drosdel.org.uk) erlaubt es, Fliegenlinien mit gewünschten FRT-Konstrukt-Insertionen auszuwählen, mit denen dann eine Deletion im spezifischen Bereich erzeugt werden kann. Diese Methode wurde sowohl für die Lücke in der *prd*-Region als auch in der *en*-Region verwendet. Eine detaillierte Beschreibung der Methode und die hierfür durchgeführten Kreuzungen befinden sich im Material und Methoden-Teil (2.4.5).

3.2.3.1 Deletionen in der *prd*-Region

Für die Lücke in der *prd*-Region wurden verschiedene FRT-Konstrukte verwendet, die zur Erzeugung von 10 unterschiedlich großen, überlappenden Deletionen verwendet werden sollten. Von diesen 10 möglichen Deletionen konnten aber nur sechs Deletionen in heterozygoten Linien etabliert werden (Abb.9 und Tab.1). Die vier Deletionen, die mit dieser Methode nicht generiert werden konnten, schließen den zytologischen Bereich von Position 34B6 bis Position 34C3 mit ein. Alle Tiere, die heterozygot für eine dieser vier Deletionen waren, wiesen typische Merkmale für eine Mutation in einem *Minute*-Locus auf. Die Fliegen hatten kurze, dünne Borsten und zeichneten sich durch eine geringe Fruchtbarkeit und Lebensdauer aus. Möglicherweise befindet sich in diesem Bereich ein haplo-insuffizienter Locus, der die Etablierung eines heterozygoten Stammes unmöglich macht. Eine Übersicht über alle Deletionen mit Angaben der Größe und Lokalisation sowie der Frequenzen liefert Tabelle 1.

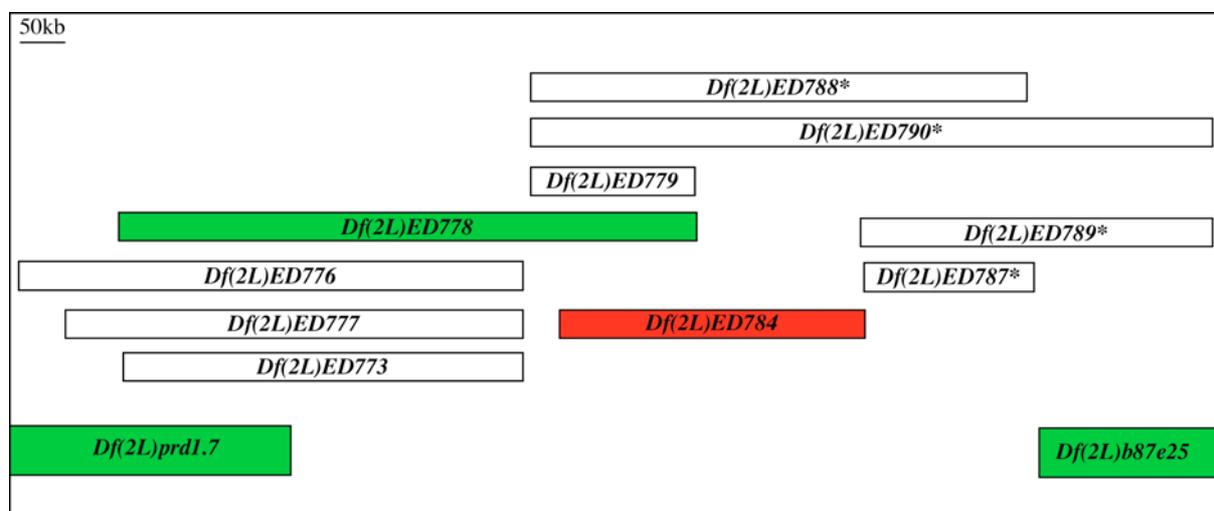


Abb.9 Neue Deletionen in der Lücke der *prd*-Region

Legende s. nächste Seite

Abb.9 Neue Deletionen in der Lücke der *prd*-Region

Die Größe der Deletionen bezieht sich auf die in der Abbildung vorgegebene Skala und spiegelt die tatsächlichen relativen Größen wider. Die höheren Balken kennzeichnen die in der Deletionskartierung untersuchten Deletionen, welche den Bereich der Lücke flankieren (vgl. Abb.6). Von Deletionen, die mit einem Stern (*) markiert sind, konnten keine Stämme etabliert werden. Weiße Balken bedeuten, dass die jeweilige Deletion nicht auf die Ausprägung eines Phänotyps getestet wurde, da sie mit weiteren getesteten Deletionen überlappt. Grüne Balken zeigen Deletionen, die getestet wurden, aber keine Mesodermwanderungsdefekte aufweisen. Rote Balken zeigen Deletionen, die Mesodermwanderungsdefekte ausprägen.

Deletion	Größe und Zytologie	Gesichtete Chromosomen	Anzahl der Kandidaten	Frequenz
<i>Df(2L)ED787</i>	174.696 bp 34B3-34C3	2400	3*	0,125 %
<i>Df(2L)ED779</i>	191.200 bp 34A3-34A7	2400	23	0,958 %
<i>Df(2L)ED784</i>	327.612 bp 34A4-34B6	2400	11	0,458 %
<i>Df(2L)ED789</i>	378.570 bp 34B6-34D1	2400	6*	0,25 %
<i>Df(2L)ED773</i>	429.227 bp 33E9-34A3	2400	16	0,666 %
<i>Df(2L)ED777</i>	490.204 bp 33E7-34A3	2400	12	0,571 %
<i>Df(2L)ED788</i>	532.404 bp 34A3-34C3	2400	0*	-
<i>Df(2L)ED776</i>	540.489 bp 33E4-34A3	2400	7	0,333 %
<i>Df(2L)ED778</i>	619.744 bp 33E9-34A7	2400	2	0,083 %
<i>Df(2L)ED790</i>	736.278 bp 34A3-34D1	2400	0*	-

Tabelle 1 Liste der neuen Deletionen in der Lücke der *prd*-Region

Die Deletionen sind der Größe nach geordnet. Kandidatenfliegen, aus denen keine Stämme etabliert werden konnten, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Zwei der hergestellten Deletionen (*Df(2L)ED778* und *Df(2L)ED784*) überlappen miteinander und decken hierbei einen großen Bereich der Lücke ab (Abb.9). Daher wurden diese Deletionen ausgewählt und mit Hilfe von immunohistochemischen Methoden auf Defekte in der Mesodermmorphogenese untersucht. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst.

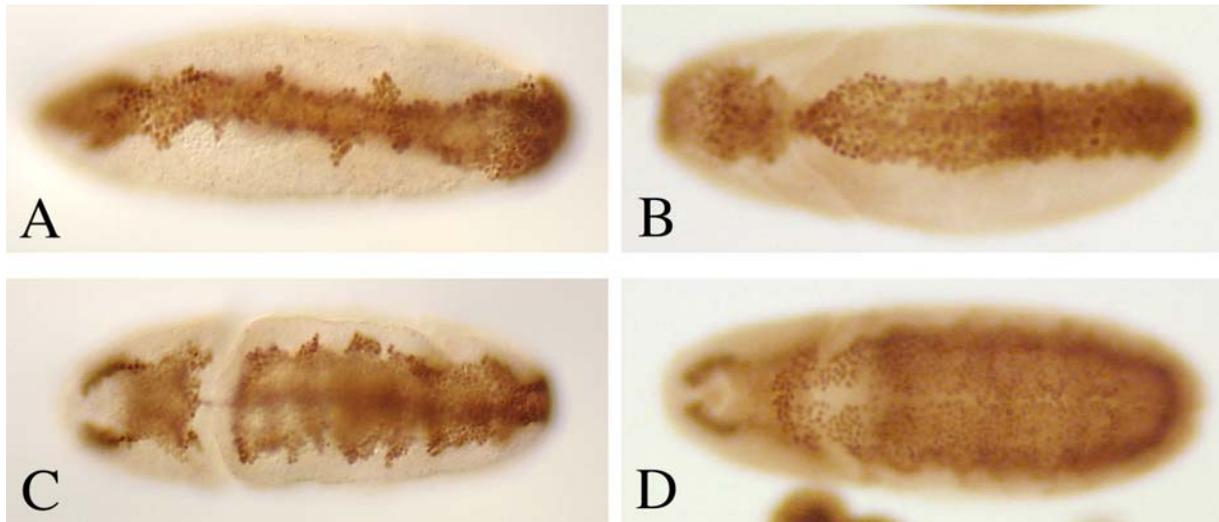


Abb.10 Phänotypen der Defizienzen *Df(2L)ED784* und *Df(2L)ED778*

(A-D) Ventrale Ansicht auf Embryonen gefärbt mit einem Antikörper gegen das Twi-Protein. ([A, Stadium 8] und [C, Stadium 10] Embryonen, die homozygot für die Deletion *Df(2L)ED784* sind. ([B, Stadium 8] und [D, Stadium 10] Embryonen, die homozygot für die Deletion *Df(2L)ED778* sind.

Da die Defizienz *Df(2L)ED778* keinen mutanten Phänotyp im Bezug auf die Mesodermwanderung ausprägt (Abb.10 B und D), wurden alle kleineren Deletionen, die in diesen Bereich fallen, nicht mehr getestet (vgl.Abb.9). Im Gegensatz dazu zeigen *Df(2L)ED784*-mutante Embryonen in allen Stadien (Abb.10A und C) einen starken Mesodermwanderungsdefekt, der die Defekte der synthetischen Deletion phänokopiert. Diese Defekte konnten nur in solchen Embryonen beobachtet werden, die aus Ablagen des ursprünglichen Deletionsstamms *Df(2L)ED784* hergestellt wurden. Wurde die Defizienz über andere Balancer-Chromosomen gekreuzt, konnten die starken Defekte in den korrespondierenden Embryonen nicht mehr gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Analyse ist notwendig, um zu entscheiden, ob die Defizienz *Df(2L)ED784* Gene enthält, die für die Mesodermwanderung essentiell sind. Da die Defizienz *Df(2L)ED784* zu einem großen Teil mit der Defizienz *Df(2L)ED778* überlappt, kann diese Analyse auf den Bereich von Position 34A7 bis Position 34B6 eingeschränkt werden.

3.2.3.2 Deletionen in der *en*-Region

Zur Abdeckung der Lücke in der *en*-Region war die Herstellung von 6 miteinander überlappenden Deletionen geplant. Da aber die zwei zuerst generierten Deletionen schon aussagekräftige Ergebnisse erzielten, wurde auf die Herstellung der übrigen Deletionen verzichtet (Abb.11). Eine Übersicht über alle Deletionen liefert Tabelle 2.

Die Untersuchung der Defizienzen *Df(2R)ED2230* und *Df(2R)ED2238* erfolgte durch Antikörperfärbungen (Abb. 12). In Embryonen, die homozygot mutant für die Defizienz *Df(2R)ED2230* sind, verläuft der Prozeß der Mesodermwanderung wie in Wildtyp-Embryonen. Die Mesodermzellen liegen geordnet im Bereich der ventralen Mittellinie (Abb.10 A) und breiten sich während des Stadiums 8 lateral aus (Abb.12 C). Im Gegensatz dazu zeigen *Df(2R)ED2238*-mutante Embryonen einen Phänotyp, der die Defekte der Transpositionsdeletion phänokopiert (vgl. Abb.4). Nach der Invagination liegen die Mesodermzellen unregelmäßig angeordnet auf dem Ektoderm (Abb.12 B). In späteren Embryonen ist erkennbar, dass eine gerichtete Wanderung gestört ist (Abb.12 D).

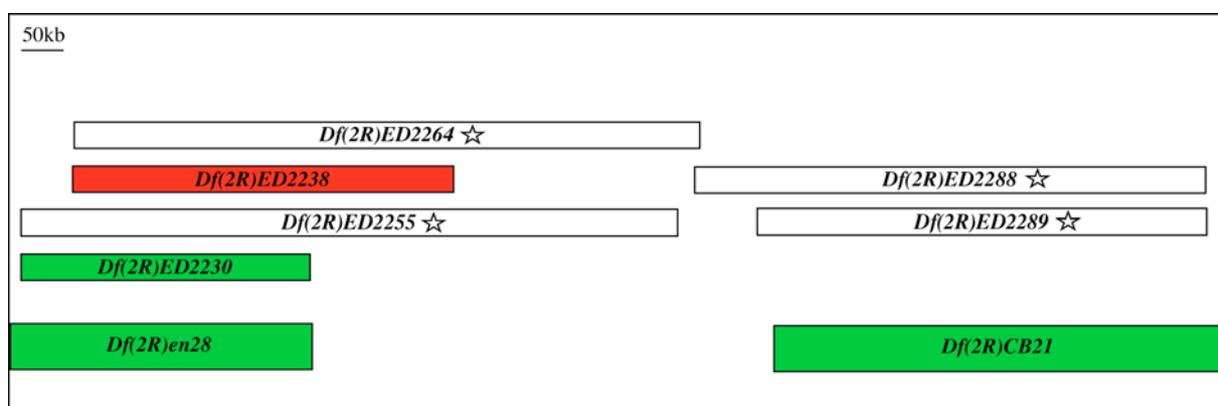


Abb.11 Neue Deletionen in der Lücke der *en*-Region

Die Größe der Deletionen bezieht sich auf die in der Abbildung vorgegebene Skala und spiegelt die tatsächlichen relativen Größen wider. Die höheren Balken kennzeichnen die schon in der Deletionskartierung untersuchten Deletionen, die den Bereich der Lücke flankieren (vgl. Abb.8). Deletionen, die mit einem Sternchen (☆) markiert sind, wurden nicht hergestellt. Grüne Balken zeigen Deletionen, die getestet wurden, aber keine Mesodermwanderungsdefekte aufweisen. Rote Balken zeigen Deletionen, die Mesodermwanderungsdefekte ausprägen.

Deletion	Größe und Zytologie	Gesichtete Chromosomen	Anzahl der Kandidaten	Frequenz
<i>Df(2R)ED2230</i>	341.051 bp 47F7-48C2	2400	2	0,083 %
<i>Df(2R)ED2238</i>	439.100 bp 47F13-48D1	2400	3	0,125 %
<i>Df(2R)ED2288</i>	518.835 bp 48F5-49D3	-	-	-
<i>Df(2R)ED2289</i>	606.538 bp 48E4-49D3	-	-	-
<i>Df(2R)ED2264</i>	721.369 bp 47F13-48E4	-	-	-
<i>Df(2R)ED2255</i>	779.894 bp 47F7-48E3	-	-	-

Tabelle 2 Liste der neuen Deletionen in der *en*-Region

Die Deletionen in der Tabelle sind der Größe nach geordnet. Aus Gründen der Vollständigkeit sind auch diejenigen Deletionen mit aufgeführt, die nicht hergestellt wurden.

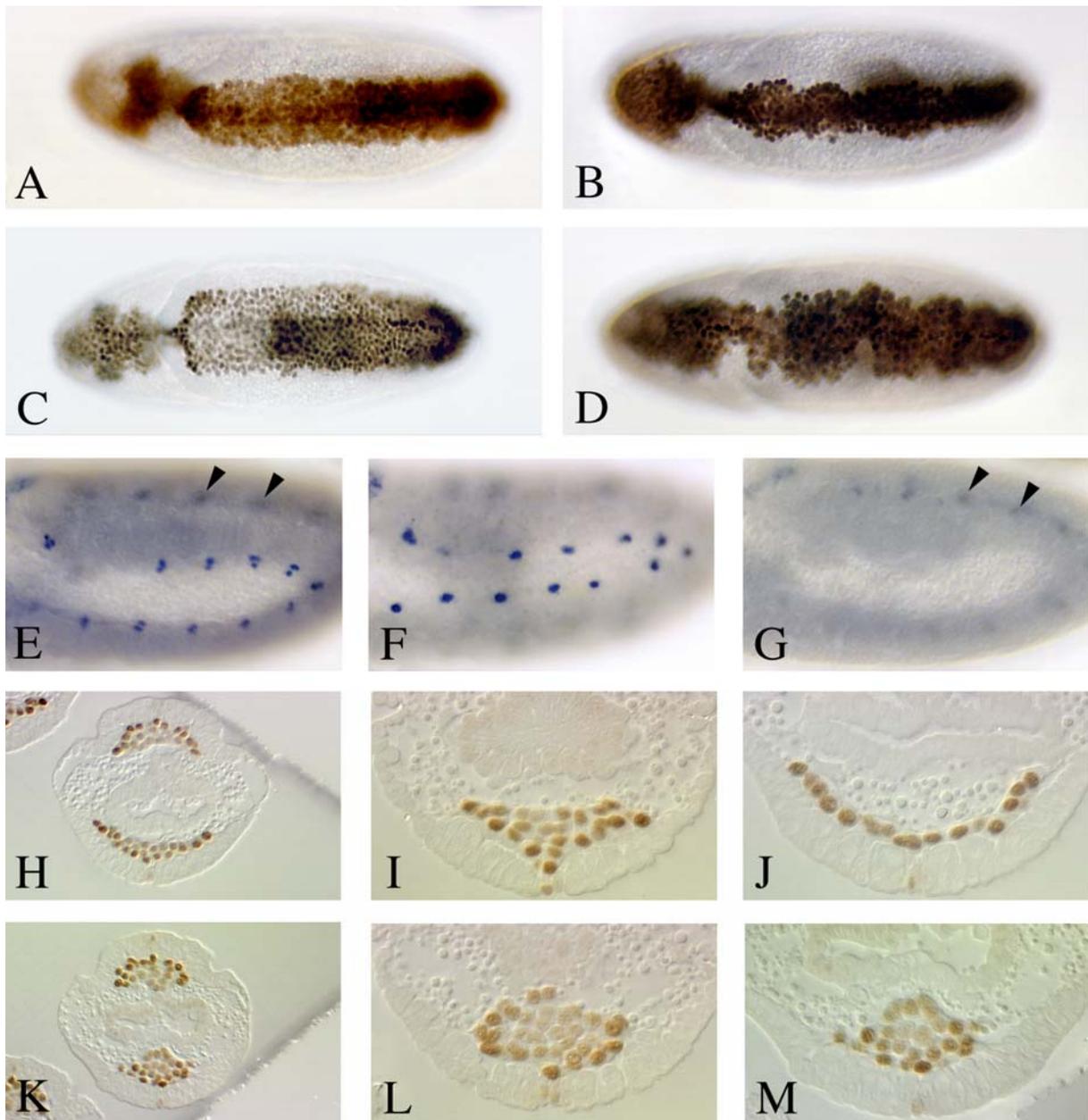


Abb.12 Mesodermphänotypen der Deletionen *Df(2R)ED2230* und *Df(2R)ED2238*

(A-D) Ventrale Ansicht auf Embryonen gefärbt mit einem Antikörper gegen das Twi-Protein. ([A, frühes Stadium 8] und [C, spätes Stadium 8]). ([B, frühes Stadium 8] und [D, spätes Stadium 8]) *Df(2R)ED2238*-mutante Embryonen. (E-G) Laterale Ansicht auf Embryonen in Stadium 11 gefärbt mit einem Antikörper gegen das Eve-Protein. (E) Wildtyp-Embryo, (F) *Df(2R)ED2230*-mutanter Embryo und (G) *Df(2R)ED2238*-mutanter Embryo. Die Pfeilköpfe sind auf die Eve-positiven Zellen im Nervensystem gerichtet. (H-M) Querschnitte von Embryonen gefärbt mit einem Antikörper gegen das Twi-Protein. in Stadium 8 (I und L) oder in Stadium 9 (H, K, J, M). (H-J) *Df(2R)ED2230*-mutante Embryonen zeigen eine wildtypische Mesoderm Ausbreitung. (K-M) Die Mesodermzellen in *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen verbleiben als Aggregat auf dem Ektoderm.

Eine weiterführende Analyse mit Antikörperfärbungen gegen das Eve-Protein bestätigte diese Resultate. In Wildtyp-Embryonen wird *eve* während Stadium 11 der Embryogenese in 11 Clustern eines dorsalen Mesodermderivates, den Perikardialzellen, und im Nervensystem exprimiert (vgl. Abb.12E). Falls der Prozess der Wanderung nicht oder zu spät und unregelmäßig einsetzt, werden die Perikardialzellen nicht spezifiziert und exprimieren kein

eve. Die Abwesenheit von *eve*-positiven Zellgruppen ist unter anderem auch in *heartless(htl)*-mutanten Embryonen zu beobachten (Beiman et al., 1996). In *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen wird die Spezifizierung der *eve*-positiven Zellen unterbunden, während die Expression von *eve* im Nervensystem normal erscheint (Abb.12 G). Die Abwesenheit der dorsalen Mesodermderivate ist also höchstwahrscheinlich eine Folgeerscheinung der gestörten Wanderung. Embryonen, die für den Bereich der Defizienz *Df(2R)ED2230* homozygot deletiert sind, zeigen hingegen eine weitgehend normale Expression von *eve*. Diese Daten werden auch durch Querschnitte an Embryonen bestätigt, die homozygot mutant für eine der beiden Defizienzen sind. Während Embryonen, die homozygot für die Defizienz *Df(2R)ED2230* sind, eine wildtypische Ausbreitung des Mesoderms zeigen, die in der Bildung eines einschichtigen Gewebes resultiert, verbleiben die Mesodermzellen in *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen als kompaktes Aggregat auf dem Ektoderm. Eine Ausbreitung findet hier nicht statt.

Für die *en*-Region trifft damit die Annahme zu, dass das für die Wanderung essentielle Gen bzw. die essentiellen Gene innerhalb der Lücke lokalisiert sind und von der neu hergestellten Defizienz *Df(2R)ED2238* abgedeckt werden.

3.3 Identifizierung der verantwortlichen Gene in der *en*-Region

3.3.1 Expressionsprofile und Homologien von *CG12443* und *CG13194*

Der Bereich, in dem das für den Mesodermwanderungsdefekt verantwortliche Gen lokalisiert ist, kann durch die Überlappung von *Df(2R)ED2230* und *Df(2R)ED2238* eingegrenzt werden.

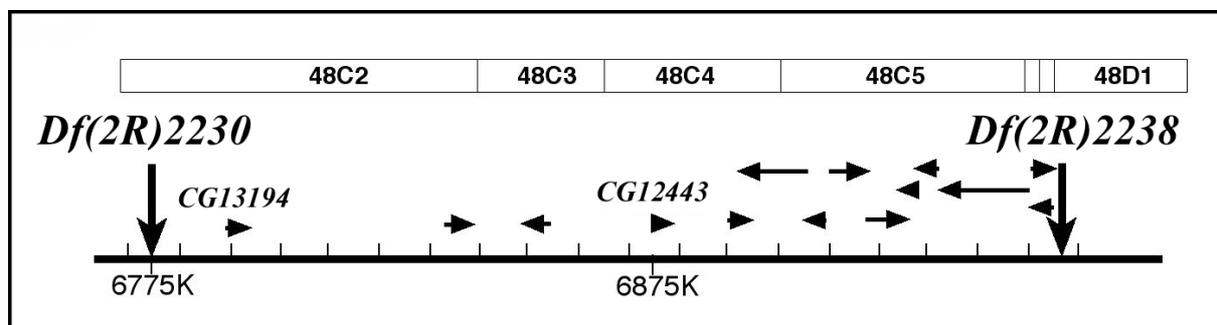


Abb.13 Vierzehn Gene lokalisieren zwischen den distalen Bruchpunkten von *Df(2R)ED2230* und *Df(2R)ED2238*

Darstellung der genomischen Region von Position 48C2 bis Position 48D1 basierend auf den Angaben der 3. Fassung der *Drosophila* Genomsequenz (www.flybase.bio.indiana.edu). Die distalen Bruchpunkte der Defizienzen sind als vertikale Pfeile dargestellt. Horizontale Pfeile und Pfeilköpfe stellen die vorhergesagten Transkriptionseinheiten einschließlich der Leserichtung dar. Es sind nur diejenigen Gene (*CG12443* und *CG13194*) namentlich hervorgehoben, die im Folgenden von Bedeutung sind.

Da die Defizienz *Df(2R)ED2230* die Mesodermwanderung nicht beeinflusst, muss das Gen zwischen den distalen, chromosomalen Bruchpunkten von *Df(2R)ED2230* und *Df(2R)ED2238* liegen (vgl. Abb.11; Abb.13). Dieser Bereich umfasst ein Intervall von 179.926 bp genomischer DNA. Innerhalb dieses Intervalls wurden mit Hilfe der 3. Fassung des *Drosophila*-Genannotierungs-Projektes 14 Gene vorhergesagt (Abb.13). Da der ursprüngliche, genetische Ansatz mit synthetischen Defizienzen nur Phänotypen produziert, die auf dem Verlust von zygotischen Genfunktionen beruhen können, wurde daraus geschlossen, dass das gesuchte Gen ein eindeutig zygotisches Expressionsprofil besitzen muss. Beim Vergleich der Expressionsprofile aller 14 Gene, konnten nur zwei Gene (*CG12443* und *CG13194*) identifiziert werden, die früh zygotisch exprimiert werden, gleichzeitig aber keine maternale Expression aufweisen (Abb.14 A). Diese Expressionsprofile sind frei zugängliche Daten, die mit Hilfe von Mikroarrays ermittelt und durch Computerprogramme ausgewertet wurden (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl).

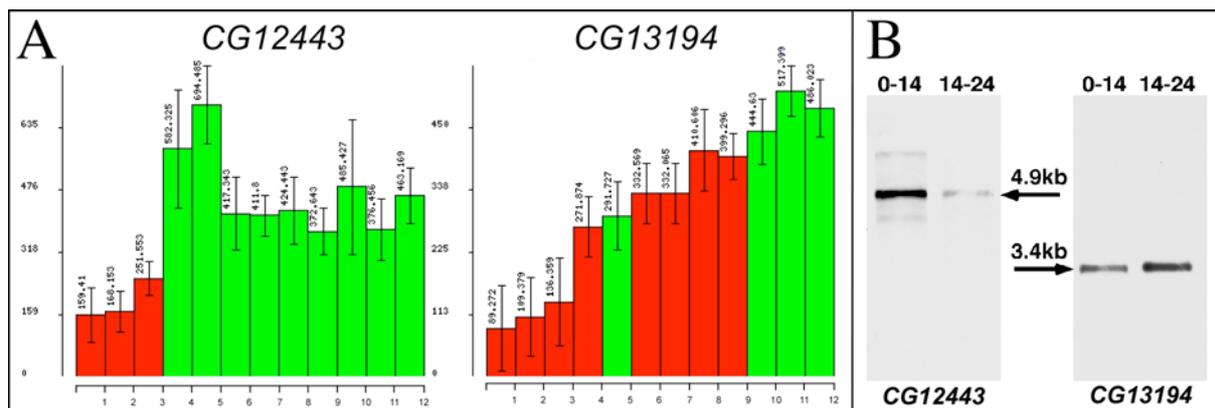


Abb.14 Expressionsprofil und Northern-blot-Analyse von *CG12443* und *CG13194*

(A) Expressionsprofile von *CG12443* und *CG13194*. Aufeinander folgende Zeitpunkte, die RNA-Proben aus unterschiedlich alten Embryonen repräsentieren, sind auf der x-Achse dargestellt. Die y-Achse zeigt die absoluten Expressionswerte, die von der dChip-Software analysiert wurden (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl). (B) Northern-blot mit je 5µg polyA⁺-RNA pro Spur aus 0-14h und 14-24h alten Wildtyp-Embryonen hybridisiert mit RNA-antisense-Sonden der Gene *CG12443* und *CG13194* (vgl. Material und Methoden). Im Falle von *CG12443* läßt sich ein Haupttranskript von etwa 4.9 kb detektieren. Die Transkriptgröße von *CG13194* liegt bei ca. 3.4 kb.

Um diese computergestützten Daten zu verifizieren und um sicher zu gehen, dass diese beiden Gene im Embryo früh exprimiert werden, wurde mit RNA-antisense-Sonden beider Gene jeweils eine Northern-blot-Analyse durchgeführt (Abb.14 B). Im Northern-blot detektiert die RNA-antisense-Sonde von *CG12443* hauptsächlich ein Transkript mit einer Größe von 4.9 kb, wobei im ersten Zeitfenster zusätzlich eine sehr schwache größere Bande detektiert wird. In Embryonen bis Stadium 11 (0-14h) wird das 4.9 kb Transkript deutlich stärker exprimiert als in späteren Stadien. Die RNA-antisense-Sonde von *CG13194* detektierte eine einzelne ca.

3.4 kb große Bande. Die Expression dieses Gens verändert sich dabei im Laufe der Embryogenese nur geringfügig. Die Northern-blot-Analyse liefert keine Aussage darüber, ob die beiden Gene ausschließlich zygotisch exprimiert werden. Sie bestätigt nur, dass beide Gene früh in der Embryogenese exprimiert werden.

Zusätzlich gab es noch weitere Hinweise darauf, dass es sich bei *CG12443* und *CG13194* um die gesuchten Gene handeln könnte. Schon die vorhergesagten Translationsprodukte beider Gene wiesen geringe Homologien zu FGFs (Fibroblasten-Wachstumsfaktoren) in anderen Spezies auf (Daten nicht gezeigt; vgl. Abb.15), wobei jedoch weder eine vollständige FGF-Kerndomäne noch ein für viele FGFs typisches Signalpeptid vorhanden war. FGFs agieren als Liganden für FGF-Rezeptoren (FGFR). Das Gen *htl*, welches essentiell für die Mesodermwanderung ist (vgl. Einleitung), kodiert für einen solchen FGF-Rezeptor und sein Ligand war noch nicht bekannt.

Aufgrund dieser Homologien sowie der Tatsache, dass diese beiden Gene als einzige eine frühe zygotische Expression aufweisen, konzentrierte sich die weitere Arbeit auf diese beiden Kandidatengene.

3.3.2 Die vollständigen cDNAs von *CG12443* und *CG13194* kodieren für zwei neue FGFs

Laut Annotierung setzen sich *CG12443* und *CG13194* aus jeweils 2 Exons zusammen. Dies entspricht im Falle von *CG12443* einer Transkriptgröße von mindestens 1998 bp und die vorhergesagte Transkriptgröße von *CG13194* belief sich danach auf mindestens 2109 bp. Dabei muss beachtet werden, dass die 5'- und 3'-UTRs durch die Annotierung nicht erfasst werden. Die Ergebnisse der Northern-blot-Analyse (vgl. Abb.14) deuteten allerdings darauf hin, dass beide Gene in Wirklichkeit größer sind. Auch das jeweilige Fehlen eines Signalpeptids und die fragmentarische FGF-Kerndomäne trotz der vorhandenen Homologien zu Vertebraten-FGFs in beiden abgeleiteten Aminosäuresequenzen lieferten einen Hinweis auf die mögliche Unvollständigkeit der vorhergesagten Gene insbesondere im 5'-Bereich.

Den entscheidenden Hinweis auf die tatsächliche Organisation des *CG12443*-Lokus lieferte die Sequenz eines ESTs (Expressed Sequences Tag), das ca. 20 kb proximal zum vorhergesagten Gen kartiert. Da zwischen diesem EST (RE 28585.5) und *CG12443* keine weitere Transkriptionseinheit vorhergesagt war, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem EST um 5'-Sequenzen von *CG12443* handeln könnte. Durch die Generierung von passenden Oligonukleotide konnte daraufhin eine vollständige cDNA von *CG12443* durch RT-PCR kloniert werden (vgl. Sequenz im Anhang). Die RT-PCR lieferte ein 2.4 kb großes

Produkt, das vollständig sequenziert wurde. Die Sequenzdaten ergaben, dass *CG12443* aus vier Exons besteht, wobei die ersten drei Exons neu identifiziert wurden und nur das vierte Exon mit dem vorhergesagten 2. Exon identisch ist, d. h. es gibt 3 Exons, die nicht vorhergesagt waren und das 1. annotierte Exon existiert nicht (Abb.15A). Das offene Leseraster von *CG12443* besteht aus 2250 bp und kodiert damit für ein Translationsprodukt mit 750 Aminosäuren (vgl. Sequenzen im Anhang). Eine SMART (Schultz et al.)-Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass *CG12443* für ein neues FGF-Protein kodiert. Dieses Protein besitzt ein N-terminales Signalpeptid mit 21 Aminosäuren, Eine FGF-Kerndomäne mit 106 Aminosäuren und eine 613 Aminosäuren lange C-terminale Region, die keinerlei Homologien zu anderen Proteinen aufweist (Abb.15C).

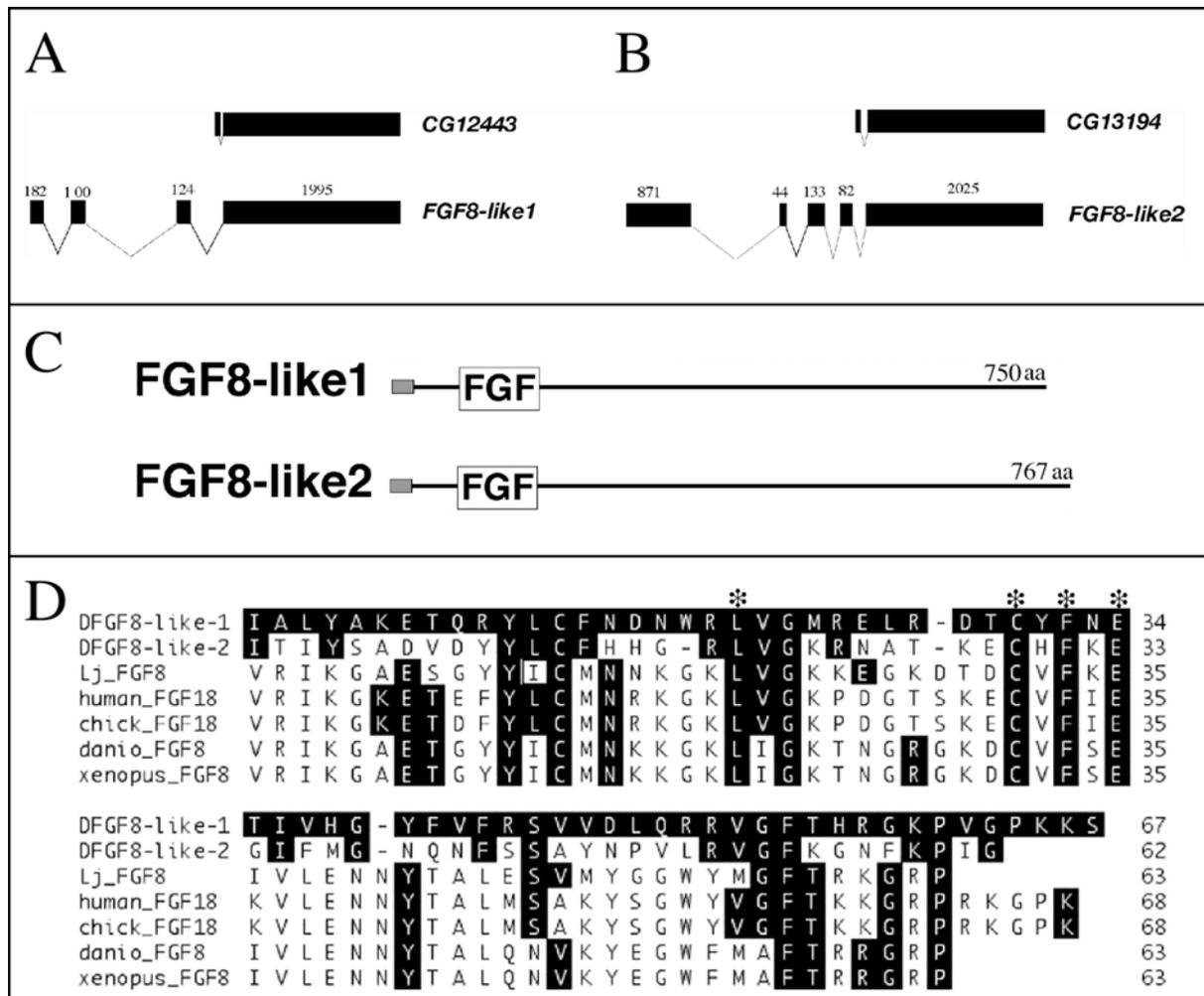


Abb.15 Gen- und Proteinstrukturen von *FGF8-like1* and *FGF8-like2*

(A und B) Ein Vergleich zwischen der vorhergesagten genomische Organisation von *CG12443* und *CG13194* und der genomischen Organisation der cDNAs. Eine genauere Beschreibung der genomischen Organisation beider cDNAs findet sich im Anhang. (C) Struktur des FGF8-like1- und FGF8-like2-Proteins. (D) Aminosäuresequenzvergleich der FGF-Kerndomänen von FGF8-like1 und FGF8-like2 mit verwandten FGF-Proteinen aus diversen Spezies. Aminosäuren, die in allen FGFs konserviert sind, sind mit einem Stern (*) markiert.

Eine ähnliche Klonierungsstrategie führte im Fall von *CG13194* leider zu keinen Ergebnissen. Daher wurde hier ein RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-Ansatz durchgeführt, um eine vollständige cDNA von *CG13194* zu erhalten. Die anschließende Sequenzierung der 3.2 kb großen cDNA ergab, dass *CG13194* aus 5 Exons besteht, wobei die ersten 4 Exons neu identifiziert wurden und nur das 5. Exon mit dem vorhergesagten 2. Exon identisch ist (Abb.15B). Das 2301 bp lange, offene Leseraster von *CG13194* kodiert für ein Protein mit 767 Aminosäuren (vgl. Sequenzen im Anhang). Dieses Protein besitzt ein N-terminales Signalpeptid mit 26 Aminosäuren, eine FGF-Kerndomäne mit 114 Aminosäuren und einen 608 Aminosäuren langen C-Terminus, der keine Homologien zu anderen Proteinen aufweist (Abb.15D). Die Aminosäuresequenz der FGF-Kerndomänen von *CG12443* und *CG13194* sind zu 39% identisch (Abb.15D). Unter allen bekannten FGFs zeigen *CG12443* und *CG13194* die höchsten Homologien zu FGFs aus der FGF8/17/18-Familie aus Vertebraten (Abb.13D). Die Identität in der Aminosäuresequenz liegt hierbei zwischen 32-35%. Aufgrund dieser Homologien sowie der Tatsache, dass *FGF8* in Vertebraten eine essentielle Rolle während der Gastrulation übernimmt (s. Diskussion), werden die Gene im nachfolgenden als *FGF8-like1* (*CG12443*) und *FGF8-like2* (*CG13194*) bezeichnet.

3.3.3 *FGF8-like1* und *FGF8-like2* werden während der Gastrulation exprimiert

Um zu testen, ob *FGF8-like1* und *FGF8-like2* während der Embryogenese in einen Muster exprimiert werden, das auf eine Funktion dieser beiden Gene während der Mesodermwanderung schließen lässt, wurden an frühen Embryonen in-situ-Hybridisierungen mit RNA-antisense Sonden durchgeführt (Abb.16).

Die erste Expression von *FGF8-like1* and *FGF8-like2* erscheint nach der Zellularisierung in zwei breiten, lateralen Streifen des neurogenen Ektoderms (Abb.16A), wobei der ventrale Bereich der Mesodermanlage ausgespart wird (Abb.16B). In früheren Stadien kann kein Transkript detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses lässt darauf schließen, dass beide Gene, wie es der genetische Ansatz fordert, keine maternale Komponente besitzen. Die Expression im Ektoderm wird während der Mesoderminvagination aufrechterhalten (Abb.16C und H) und breitet sich anterior bis zur Kopffurche und posterior bis zur Hinterdarminvagination aus. Während der Keimbandausstreckung in Stadium 8 sind zum ersten Mal Unterschiede in der Expression zu erkennen. Die Transkripte von *FGF8-like1* sind weiterhin stark im Neuroektoderm vertreten (Abb.16D). In den Bereichen der ventralen Mittellinie, der Amnioserosa und des Mesoderms wird kein Transkript detektiert (Abb.14G, I und J).

Im Gegensatz dazu schwächt sich die Expression von *FGF8-like2* ab und ist nur noch in bestimmten dorsalen Bereichen des Ektoderms zu finden (Abb.16E, Pfeilköpfe). Nach der Gastrulation wird die Expression beider Gene im Neuroektoderm herunterreguliert und verschwindet schließlich.

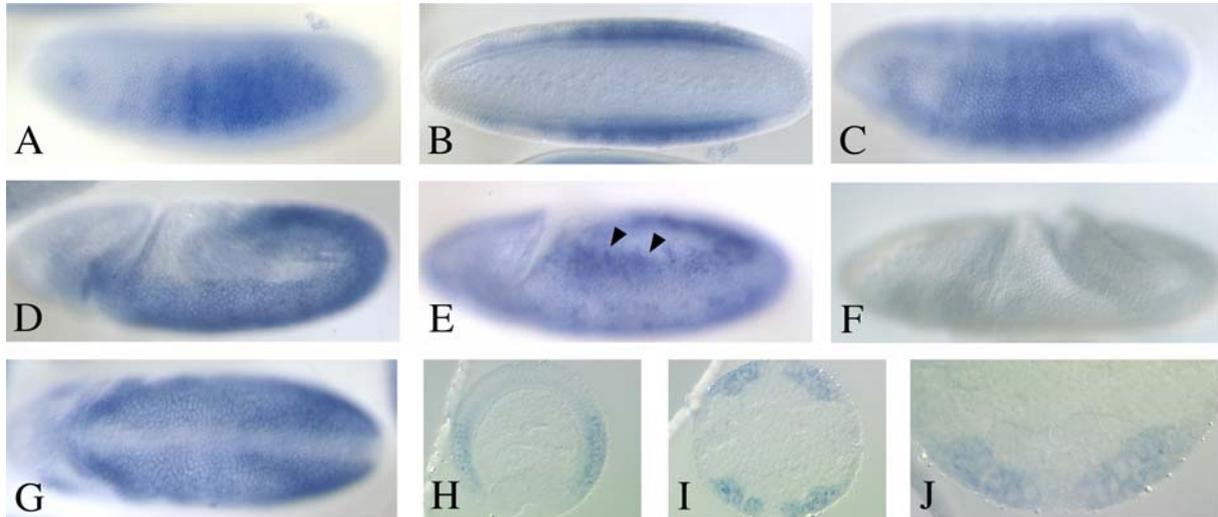


Abb.16 Expressionsmuster von *FGF8-like1* and *FGF8-like2* während der frühen Embryogenese

Laterale (A, C, D, E und F) und ventrale Ansichten (B und G) auf Wildtyp-Embryonen oder Querschnitte von Wildtyp-Embryonen (H-J), die mit einer Digoxigenin-markierten antisense-RNA von *FGF8-like1* oder *FGF8-like2* (E) hybridisiert wurden. Alle Bilder zeigen Wildtyp-Embryonen mit Ausnahme von ([F], Df(2R)2238-mutanter Embryo als Kontrolle zur Spezifität der in-situ-Hybridisierung). (A, B und H) Stadium 5; (C) Stadium 7; (D-G, I und J) Stadium 8. Das frühe Expressionsmuster von *FGF8-like1* (A-C) spiegelt auch das Expressionsmuster von *FGF8-like2* im dorsalen Ektoderm. Die Beschreibung der Expressionsmuster findet sich im Text.

Diese Analyse der Expressionsdaten zeigt, dass beide Gene in Zellen des Ektoderms exprimiert sind, die als Substrat für die Mesodermzellen während der Wanderung dienen. Die Ähnlichkeit der frühen Expression deutet möglicherweise eine redundante Funktion beider Gene bei diesem Prozess an.

3.3.4 Ausschaltung von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* durch RNAi führt zu einem *htl*-Phänotyp

Um zu beweisen, dass es sich bei den klonierten Genen tatsächlich um diejenigen handelt, deren Verlust in der Deletion *Df(2R)ED2238* zu dem mutanten Mesodermwanderungsphänotyp führt, müssen Mutationen für die einzelnen Gene getestet werden. Solche Einzelmutationen standen aber noch nicht zur Verfügung. In diesem Fall bietet die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) eine brauchbare Alternative, um zu zeigen, dass die richtigen Gene isoliert wurden. In *Drosophila* wurde diese Technik zum Ausschalten

einer Genfunktion durch das Einbringen von doppelsträngiger RNA in den Embryo bereits erfolgreich eingesetzt (Kennerdell und Carthew, 1998; Misquitta und Paterson, 1999).

Zur Ausschaltung der Genfunktion von *FGF8-like1* wurde eine 472 bp lange dsRNA hergestellt und zur Ausschaltung der Genfunktion von *FGF8-like2* eine 438 bp lange dsRNA. Da die Möglichkeit bestand, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* redundante Funktionen ausüben, wurden beide dsRNAs gemeinsam in Wildtyp-Embryonen und in transgene Embryonen injiziert (Abb. 17). Nach der Injektion konnten sich die Embryonen bis zum gewünschten Stadium weiterentwickeln und wurden dann mit Hilfe von Antikörperfärbungen auf einen Mesodermwanderungsdefekt hin untersucht.

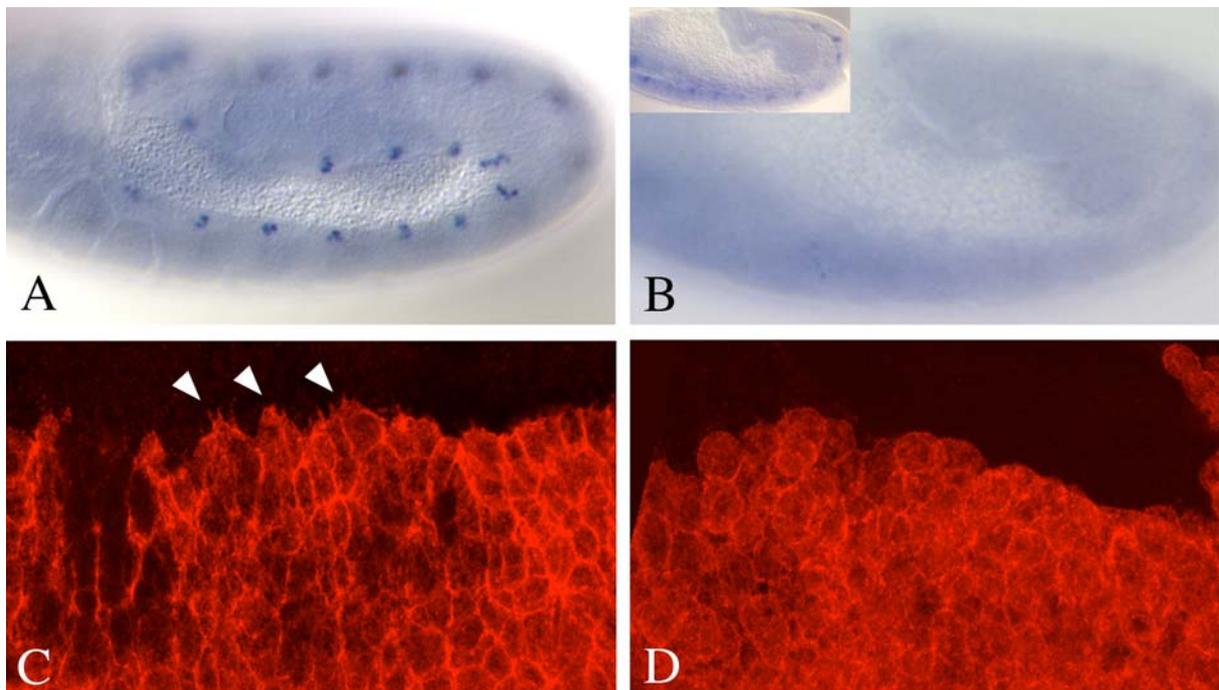


Abb. 17 Die Injektion von *FGF8-like1*- und *FGF8-like2*-dsRNA erzeugt Mesodermwanderungsdefekte.

(A-B) Laterale Ansicht auf einen Wildtyp-Embryo (A, Stadium 11) oder einen Embryo, dem dsRNA beider Gene injiziert wurde (B, Stadium 11) und die anschließend mit einem Antikörper gegen das Eve-Protein gefärbt wurden. Der kleine Ausschnitt in (B) zeigt den gleichen Embryo mit Fokus auf das zentrale Nervensystem. (C-D) Konfokale Aufnahmen von *twi::CD2*-transgenen Embryonen, die nicht injiziert wurden (C, Stadium 8) oder denen dsRNA beider Gene (D, Stadium 8) injiziert wurde und die anschließend mit einem Antikörper gegen das CD2-Protein gefärbt wurden. Die Pfeilköpfe sind auf die zellulären Ausläufer der Mesodermzellen gerichtet.

In mit dsRNA injizierten Embryonen fehlen die Eve-positiven dorsalen Mesodermderivate (Abb.17B). Die *eve*-Expression im Nervensystem ist dagegen nicht gestört. Dieses Ergebnis lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass der Prozess der Mesodermwanderung gestört ist, wenn die Genfunktionen beider FGFs gleichzeitig ausgeschaltet sind. Das Fehlen der 11 Eve-positiven Zellgruppen könnte aber auch durch Defekte in der Musterbildung des Mesoderms ausgelöst werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde das Verhalten der Mesodermzellen auf zellulärer Ebene untersucht. Dafür wurde in transgene Embryonen injiziert, die das Zelloberflächenprotein CD2 aus der Ratte unter der Kontrolle

des *twist*-Promotors exprimieren (Dunin-Borkowski und Brown, 1995). In den Kontrollembryonen sind die Mesodermzellen in Richtung ihrer Wanderung ausgestreckt und formen lange, zelluläre Fortsätze (Abb.17C). Diese Zellformveränderungen des Mesoderms vollziehen sich nicht Embryonen, in denen die Genfunktionen von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* ausgeschaltet sind (Abb.17D). Die gleichen Defekte auf zellulärer Ebene werden in *htl*-mutanten Embryonen beobachtet (Schumacher et al., 2004). Die Methode der RNA-Interferenz hat gezeigt, dass beide Gene für die Zellformveränderungen des Mesoderms während des Wanderungsprozesses benötigt werden.

3.4 *FGF8-like1* und *FGF8-like2* agieren als Liganden für den *Htl*-Rezeptor

In Wildtyp-Embryonen korreliert die Aktivierung des *Htl*-Signalweges mit der Ausbreitung der Mesodermzellen auf dem neurogenen Ektoderm. Diese Aktivierung kann durch Antikörperfärbungen gegen eine aktivierte, doppelt-phosphorylierte Form der MAP-Kinase (dpERK), eine Komponente des *Htl*-Signalweges, in den Frontzellen des wandernden Mesoderms nachgewiesen werden (Gabay et al., 1997). In *htl*-mutanten Embryonen kann in diesen Frontzellen keine aktivierte MAP-Kinase detektiert werden. Falls *FGF8-like1* und *FGF8-like2* Komponenten im *Htl*-Signalweg darstellen, würde ein Ausschalten beider Genfunktionen ebenfalls zum Verlust des MAP-Kinase-Signals führen. Um diese Annahme zu testen, wurden Embryonen, die entweder für die Defizienz *Df(2R)ED2230* oder die Defizienz *Df(2)R22338* homozygot mutant waren, mit Antikörpern gegen dpERK gefärbt (Abb.18A-F).

Df(2R)ED2230-mutante Embryonen, in denen *FGF8-like1* und *FGF8-like2* nicht deletiert sind, weisen eine normale MAP-Kinase-Aktivierung in den Mesodermzellen auf (Abb.18A und B). Im Gegensatz dazu zeigen Embryonen, die homozygot mutant für die Defizienz *Df(2R)ED2238* sind und somit die Genfunktionen von *FGF8-like1* and *FGF8-like2* verloren haben, keine Aktivierung der MAP-Kinase in den Frontzellen des wandernden Mesoderms (Abb.18D und E). Dieser Defekt in der MAP-Kinase-Aktivierung in *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen ist spezifisch für den *Htl*-Signalweg, da die Aktivierung der MAP-kinase durch andere Rezeptor-tyrosinkinase nicht beeinflusst wird. Zum Beispiel kann die Aktivierung der MAP-Kinase durch den Signalweg des EGF-Rezeptors DER in *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen sowohl im ventralen Ektoderm (Abb.18D und E) als auch in späteren Stadien in Vorläuferzellen der Tracheen nachgewiesen werden (Abb.18F).

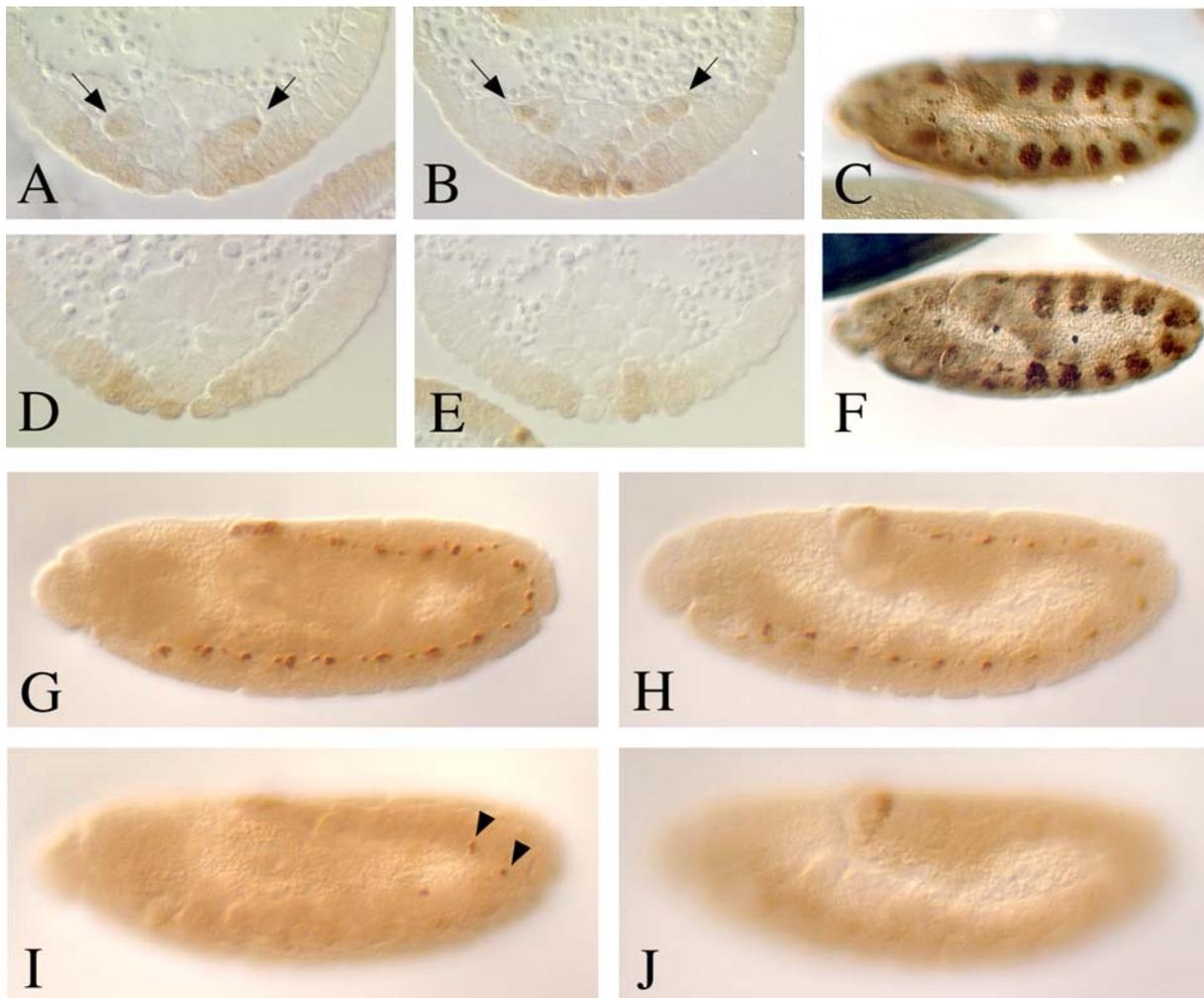


Abb.18 FGF8-like1 und FGF8-like2 aktivieren den Htl-Rezeptor

(A-F) Querschnitte und laterale Ansichten von Embryonen, die homozygot mutant für *Df(2R)ED2230* (A-C) oder *Df(2R)ED2238* (D-F) sind und mit Antikörpern gegen die aktivierte, doppelt-phosphorylierte Form der MAP-Kinase gefärbt sind. Pfeile weisen auf die aktivierte Form der MAP-Kinase im Mesoderm hin. (A und D) Stadium 7, (B und E) Stadium 8. (C und F) Als Kontrolle dient die DER-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase in den Tracheenvorläuferzellen in Stadium 10. (G-J) Laterale Ansichten von *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen in Stadium 11, die mit einem Antikörper gegen das Eve-Protein gefärbt sind. G und I zeigen einen Embryo in verschiedenen Fokusebenen, in dem eine konstitutiv-aktive Form von *htl* überexprimiert wurde. H und J zeigen einen Embryo in verschiedenen Fokusebenen, in dem eine wildtypische Form von *htl* überexprimiert wurde. Pfeilköpfe sind auf die Perikardialzellen gerichtet.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like 2* für die Htl-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase benötigt werden, stellte sich die Frage, auf welcher Ebene die beiden Gene in diesen Signalweg eingreifen. Die einfachste Hypothese, ausgehend von der Proteinstruktur beider Gene ist, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* für Liganden kodieren, die für die Aktivierung des Htl-Rezeptors benötigt werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden genetische Rettungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene transgene Formen des Htl-Rezeptors unter der Kontrolle eines *twi*-Gal4-Aktivators im Mesoderm von *Df(2R)ED2238*-mutanten Embryonen überexprimiert (Abb.18H-J). In mutanten Embryonen, die eine wildtypische Form des Htl-Rezeptors überexprimieren, können keine *eve*-positiven dorsalen Mesodermderivate detektiert werden (Abb.18J).

Das Muster der Eve-Expression im zentralen Nervensystem zeigt dagegen keine Veränderungen (Abb.16H). Die Überexpression einer konstitutiv-aktiven Form des Htl-Rezeptors ist im Bezug auf die Perikardialzellen hingegen teilweise in der Lage den mutanten Phänotyp der Defizienz zu retten (Abb.18I). Dieses Ergebnis belegt, dass FGF8-like1 und FGF8-like2 im Htl-Signalweg eine Rolle bei der Aktivierung des Htl-Rezeptors spielen. Alle gefundenen Daten sind mit einem Modell konsistent, in welchem FGF8-like1 und FGF8-like2 Liganden für den Htl-FGF-Rezeptor repräsentieren und vermittelt über diesen Rezeptor die Wanderung der Mesodermzellen regulieren.

3.5 Die Funktion von FGF8-like2 kann teilweise durch FGF8-like1 ersetzt werden

Die Analyse der in-situ-Hybridisierungen von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* zeigte, dass beide Gene während der Wanderung der Mesodermzellen im Neuroektoderm exprimiert sind. Diese gleichzeitige Expression deutet eine redundante Funktion der beiden Gene während dieses Prozesses an. Die Untersuchung von Einzelmutanten kann die Frage zu klären, ob beide Gene essentiell sind und inwieweit ein Gen die Funktion des anderen übernehmen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Nullmutante von *FGF8-like2* mit Hilfe einer P-Element-Insertion hergestellt.

Bei P-Elementen, die in der *Drosophila*-Genetik eingesetzt werden, wurde die Transposase-Funktion zerstört und durch einen Selektionsmarker ersetzt. Trotzdem können diese P-Elemente durch eine unabhängige Transposase-Quelle mobilisiert werden. Eine solche Mobilisierung führt in den meisten Fällen dazu, dass das P-Element vollständig aus dem ursprünglichen Insertionsort entfernt wird. In wenigen Fällen wird das P-Element ungenau aus dem Genom geschnitten, wobei ein Ende des P-Elements und der Selektionsmarker zerstört werden und oft flankierende DNA deletiert wird (vgl. Abb.19D). Diese Methode der ungenauen P-Element Exzision wurde verwendet, um eine Einzelmutante zu erzeugen. Dabei wurde eine P-Element-Insertion (P(2)5-SZ-3066) ausgewählt, die ca. 1kb proximal vor dem Transkriptionsstart von *FGF8-like2* lokalisiert. Die nach einer Mobilisierung entstandenen Linien (vgl. Material und Methoden) wurden durch PCR auf eine ungenaue Exzision hin getestet. Zwei der getesteten Linien besitzen eine durch ungenaue Exzision hervorgerufene Deletion in Richtung des Transkriptionsstartes von *FGF8-like2*. Abbildung 19 zeigt die PCR-Auswertung von einer dieser Linien, der Linie *P(2)5-SZ-3066^{rev18}*. Das Vorhandensein der 700bp-Bande in Spur 6 beweist, daß das proximale Ende des P-Elementes erhalten geblieben ist. In Spur 7 und Spur 8 fehlt jeweils diejenige 500 bp Bande, die in der Kontroll-PCR für

das vollständige P-Element (Spur 3 und 4) vorhanden ist. Das distale Ende des P-Elementes ist also durch eine ungenaue Exzision verloren gegangen. Weitere PCR-Tests haben ergeben, dass sich der Bereich der Deletion über das gesamte Gen *FGF8-like2* ausdehnt und dass das nächste gelegene Gen *CG13193* nicht mehr betroffen ist (vgl. Abb.19 E). Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Linie *P(2)5-SZ-3066^{rev18}* um eine Nullmutation von *FGF8-like2* handelt.

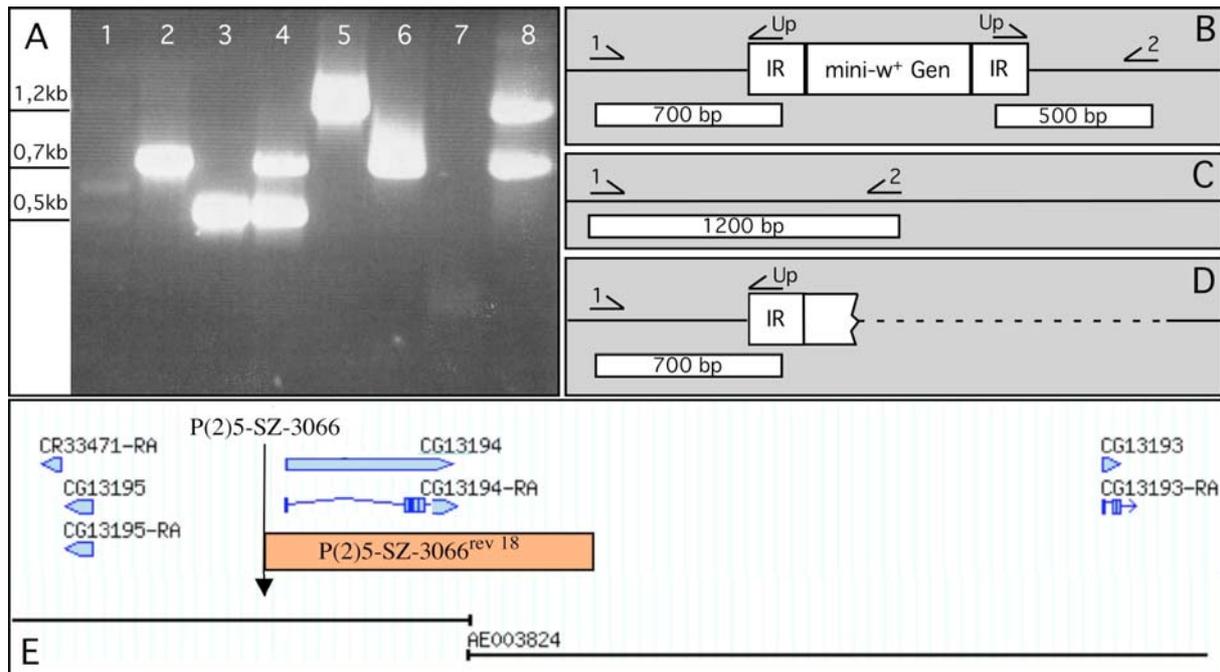


Abb. 19 Darstellung einer ungenauen P-Element-Exzision durch PCR

(A) Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die auf der DNA der ursprünglichen, homozygoten P-Element-Linie (*P(2)5-SZ-3066*) synthetisiert wurden (1-4) oder auf der DNA der Fliegenlinie *P(2)5-SZ-3066^{rev18}* (5-8). Die ursprüngliche P-Element-Linie besitzt zwei identische 2. Chromosomen; schematisch dargestellt in (B). Die Fliegenlinie *P(2)5-SZ-3066^{rev18}* besitzt ein Balancerchromosom (C) und das Chromosom, auf dem die ungenaue Exzision stattgefunden hat (D). Folgende Primer wurden für die jeweilige PCR eingesetzt: **Spur 1 und 5:** Primer1 und 2; **Spur 2 und 6:** Primer 1 und Up; **Spur 3 und 7:** Primer 2 und Up; **Spur 4 und 8:** Primer 1,2 und Up. (E) Schematische Darstellung der Deletion von *P(2)5-SZ-3066^{rev18}* (orange Box). Der ursprüngliche Insertionsort von *P(2)5-SZ-3066* ist durch den Pfeil angegeben. Die blauen Pfeile entsprechen den für diese Region vorhergesagten Genen.

Die Linie *P(2)5-SZ-3066^{rev18}* ist semiletal. Etwa 1 % der für die Exzision homozygoten Tiere erreicht das adulte Stadium. Die homozygoten Tiere haben eine nur kurze Lebensdauer und weisen Defekte im adulten Flügel auf (Abb.20F). Der Flügel von *Drosophila* besteht aus einem dorsalen und einem ventralen Flügelblatt, die durch den Flügelrand getrennt sind und normalerweise aneinander haften. Zwischen den beiden Flügelblättern bilden sich die Flügelvenen aus (Abb.20E). In *P(2)5-SZ-3066^{rev18}*-homozygoten Fliegen füllt sich der Raum zwischen dem dorsalen und dem ventralen Flügelblatt mit Flüssigkeit (Abb.20F). Die ist ein

gradueller Prozess, was bedeutet, dass die Flügel kurz nachdem sie ausgehärtet sind, noch wildtypisch aussehen und sich erst mit zunehmender Lebensdauer verändern.

Embryonen, die homozygot für $P(2)5\text{-SZ-3066}^{rev18}$ sind, prägen in Bezug auf die Perikardialzellen einen variablen Phänotyp aus. Sie lassen sich in zwei Klassen aufteilen. Embryonen, die keine oder nur eine geringfügige Zahl von *eve*-positiven Mesodermderivaten aufweisen (Abb.20A und B) und Embryonen, die alle oder beinahe alle Perikardialzellen besitzen (Abb.20C und D). Das Auftreten der letzten Klasse musste gefordert werden, da es lebensfähige, adulte Tiere gibt. Um zu testen, ob die Variabilität des Phänotyps temperaturabhängig ist, wurden $P(2)5\text{-SZ-3066}^{rev18}$ -Stämme auf verschiedenen Temperaturen gehalten (18°, 25° und 29°). Unter den Nachkommen aller Stämme entwickelten sich homozygote, adulte Tiere, die die oben beschriebenen Flügeldefekte ausprägten. Somit ist ein Einfluss der Temperatur auf den Phänotyp unwahrscheinlich.

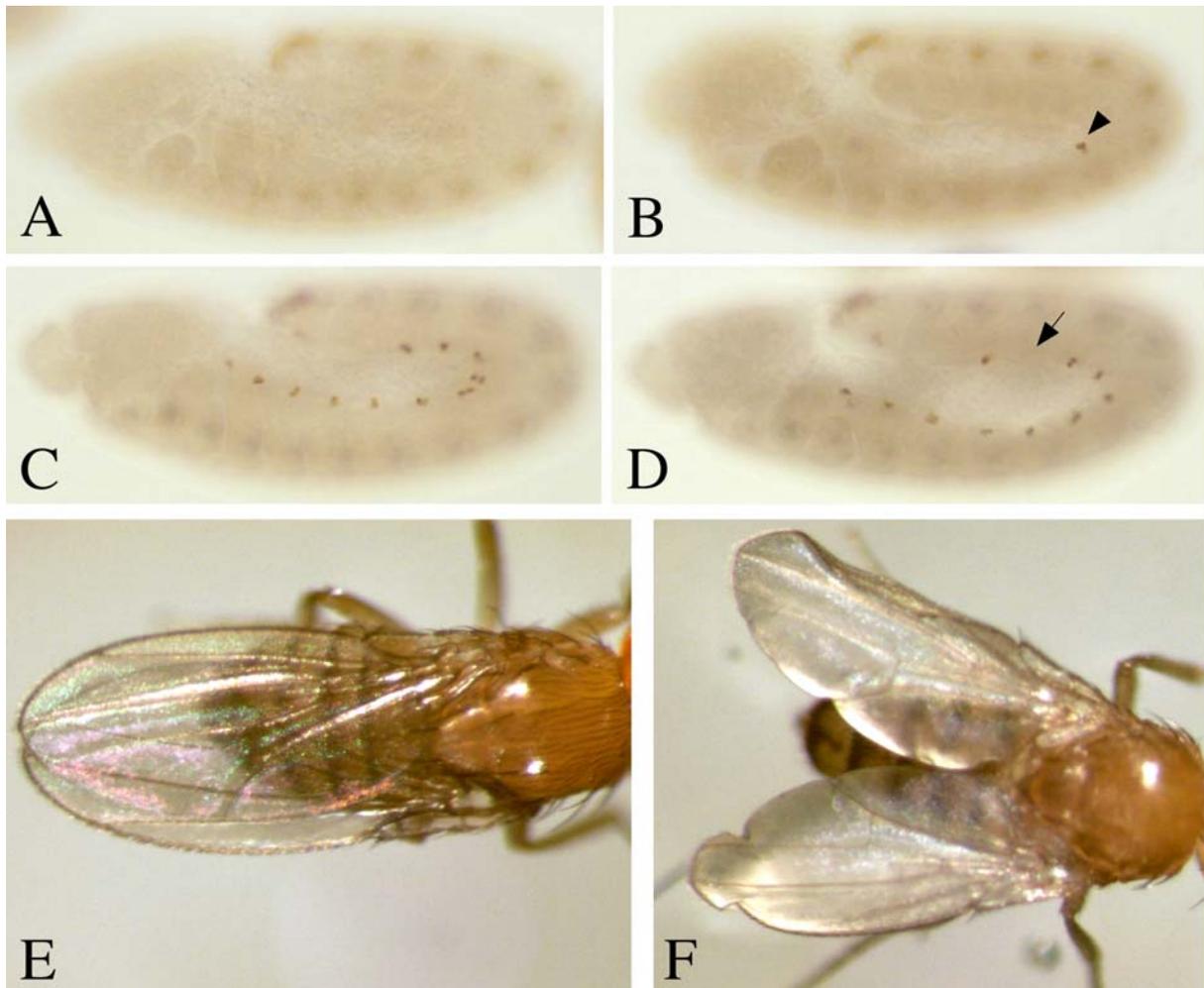


Abb.20 Embryonale und adulte Phänotypen von *FGF8-like2*-Einzelmutanten ($P(2)5\text{-SZ-3066}^{rev1}$)
(A-D) Laterale Ansicht auf Embryonen in Stadium 11, die homozygot mutant für $P(2)5\text{-SZ-3066}^{rev18}$ sind und mit Antikörpern gegen das Eve-Protein gefärbt wurden. Der Pfeilkopf (B) zeigt eine einzelne Gruppe von Perikardialzellen und der Pfeil (D) weist auf eine fehlende Gruppe von Perikardialzellen hin. (E und F) Ausschnitte von dorsalen Ansichten auf eine Wildtyp-Fliege (E) oder eine Fliege, die homozygot mutant für $P(2)5\text{-SZ-3066}^{rev18}$ ist (F).

3.6 Die Charakterisierung des FGF8-like1-Proteins

Antikörper ermöglichen sowohl eine biochemische Analyse von Proteinen als auch ihre Detektion im Gewebe. Hierdurch können oftmals Aussagen über mögliche Funktionen der Proteine und ihre posttranslationale Modifikationen getroffen werden.

Um FGF8-like1 und FGF8-like2 genauer zu untersuchen, wurden von der Firma *Eurogentec*, Belgien, durch die Immunisierung zweier Kaninchen Antikörper gegen Peptide aus FGF8-like1 und FGF8-like2 hergestellt (vgl. Material und Methoden). Die hieraus gewonnenen, affinitätsgereinigten Antikörper wurden durch Antikörperfärbungen und Western-blotting auf ihre Spezifität hin untersucht.

Antikörpernfärbungen gegen FGF8-like1 oder FGF8-like2 an Embryonen mit führten trotz der Verwendung von unterschiedlichen Fixierungsmethoden und verschiedenen Verdünnungen der Antikörper zu keinem spezifischen Signal (Daten nicht gezeigt; vgl. Abb.21B). Im Western-blot detektierten beide Antikörper keine Proteine, die den auf der Basis der cDNA errechneten Größen von FGF8-like1 oder FGF8-like2 entsprachen (Daten nicht gezeigt).

Um zu klären, ob die hergestellten Antikörper das jeweilige Antigen erkennen können, wurde FGF8-like1 durch die Verwendung des GAL4/UAS-Systems überexprimiert, da für FGF8-like1 ein entsprechendes Effektor-konstrukt vorlag. Dazu wurde das vollständige Leseraster von *FGF8-like1* mit Ausnahme der letzten 39, am 3'-Ende gelegenen Basenpaare in den Expressionsvektor pUAST-HA kloniert (vgl. Sequenzen im Anhang). Dies ermöglicht nach der Transformation des Vektors in Fliegen die Expression eines Fusionsproteins, das aus FGF8-like1 und einen C-terminalen HA(Hämagglutinin) besteht. Im vorliegenden fall wurde dieses fusionsprotein mit Hilfe des UAS-GAL4-systems unter der kontrolle des *en*-promotors ektopisch exprimiert (vgl. Abb.21).

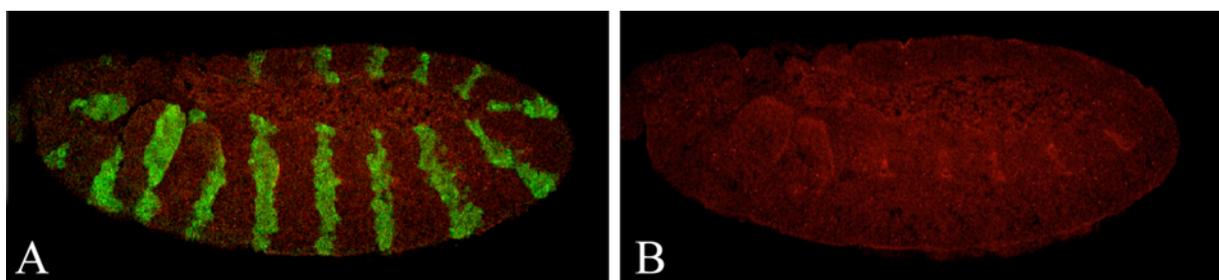


Abb.21 Die Überexpression von FGF8-like1

Laterale Ansicht auf einen Embryo im Stadium 11, in dem das pUAS-*FGF8-like1*-Effektor-konstrukt unter der Kontrolle des *en*-Promotors überexprimiert wurde und der mit Antikörpern gegen das HA-Protein (grün) und gegen FGF8-like1 (rot) gefärbt wurde. (A) zeigt den gleichen Embryo wie (B)

Der Vorteil eines markierten Fusionsproteins (FGF8-like1 plus HA) wird deutlich, wenn das überexprimierte Protein nachgewiesen werden soll und kein funktionsfähiger Antikörper für das eigentliche Zielprotein, in diesem Fall FGF8-like1, vorhanden ist. Selbst wenn *FGF8-like1* überexprimiert wird, erkennt der FGF8-like1-Antikörper das Protein nicht, obwohl es vorhanden ist, wie die HA-Markierung beweist (Abb.21). Dieses zeigt, dass der Antikörper gegen FGF8-like1 nicht in der Lage ist sein Antigen zu erkennen und daher keine weiteren Untersuchungen mit diesem Antikörper durchgeführt werden können.

4 Diskussion

4.1 Der Aneuploidie-Ansatz zur Identifizierung neuer Gene

Die Identifizierung von an Entwicklungsprozessen beteiligten Genen kann in *Drosophila melanogaster* durch unterschiedliche Ansätze erfolgen. Bei genetischen Ansätzen werden Genfunktionen durch Mutationen ausgeschaltet und auf der Basis des entstandenen Phänotyps Rückschlüsse auf die normale Funktion des Gens in der Entwicklung gezogen.

Der in dieser Arbeit verwendete genetische Ansatz hat sich als schnelle und effektive Methode bewährt, um nach zygotisch aktiven Genen in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* zu suchen. Durch die Herstellung von synthetischen Defizienzen mit Hilfe von Transpositionen können mit nur 31 Kreuzungen über 99% des Genoms abgedeckt werden (Müller et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurden zu Beginn dieser Arbeit noch 161 konventionelle Deletionen benötigt, um ca. 70% des Genoms abzudecken (Harbecke und Lengyel, 1995). Im Rahmen diverser Forschungsprojekte werden neue Methoden entwickelt, um Deletionen herzustellen, die eine möglichst vollständige Abdeckung des gesamten Genoms ermöglichen. Trotzdem bieten die synthetischen Defizienzen gegenüber normalen Deletionen einen entscheidenden Vorteil: Während weibliche Fliegen aus Deletionsstämmen heterozygot für die von in dieser Deletion betroffenen Gene sind und die Nachkommen daher auch maternale Dosiseffekte ausprägen könnten, werden für die Herstellung von synthetischen Defizienzen Compound-Weibchen verwendet, die eine vollständige maternale Dosis an ihre Nachkommen weitergeben. Die in den synthetischen Defizienzen auftretenden Phänotypen beruhen also ausschließlich auf dem Verlust zygotischer Genfunktionen.

Eine Einschränkung erfährt dieser Ansatz dadurch, dass die Entwicklung der Embryonen nach der Keimbandausstreckung durch die hohe Anzahl an deletierten Genen und den hieraus resultierenden additiven Effekten stark beeinträchtigt ist. Da der Prozess der Mesodermwanderung zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen ist, ist eine Auswirkung dieser Effekte auf die gefundenen Mesodermphänotypen unwahrscheinlich. Hingegen ist es durchaus möglich, dass die in synthetischen Defizienzen auftretende Haploidie und Triploidie Einfluss auf die Mesodermphänotypen nimmt. Um solche Probleme auszuschließen, sollten auch Embryonen auf den gesuchten Phänotyp getestet werden, die nur für den Bereich der Transposition homozygot deletiert sind. Dieses ist oftmals aber nur unter großem Aufwand genetisch umzusetzen und langwierig.

Die synthetischen Defizienzen der *en*- und *prd*-Regionen wurden auf Einflüsse durch aneuploide Effekte getestet. Für die *en*-Region zeigte sich bei diesem Kontrollexperiment, dass der starke Mesodermwanderungsphänotyp durch die Deletion des Transpositionsereiches und einen zusätzlichen haploiden Lokus hervorgerufen wird. Zusätzlich zu den identifizierten Genen *FGF8-like1* und *FGF8-like2* existiert in dieser Region also ein weiterer Lokus, der den mutanten Phänotyp dieser Gene verstärkt. Die Identifikation dieses Gens könnte weitere Erkenntnisse über die Regulation der Mesodermwanderung liefern. Für die synthetische Defizienz der *prd*-Region konnten keine aneuploiden Einflüsse nachgewiesen werden.

Trotz dieser Einschränkungen ist die Verwendung von synthetischen Defizienzen eine effektive Methode, um genomische Bereiche zu identifizieren, die für die frühe Embryogenese benötigte Gene beinhalten.

Die phänotypische Analyse kleinerer, konventioneller Deletionen sollte die Lokalisation der für die Wanderung notwendigen Gene weiter eingrenzen. Die vorhandenen Deletionslinien zeigten jedoch keinen starken Mesodermwanderungsphänotyp und sowohl für die *en*- als auch für die *prd*-Region gab es Bereiche, die nicht durch Deletionen abgedeckt waren.

Da Deletionen für genetische Analysen sehr nützlich sind, sind viele Methoden entwickelt worden, um neue Deletionen in *Drosophila* zu erzeugen. Vor Beginn dieser Arbeit hatte sich jedoch gezeigt, dass zwei verwendete Methoden (Röntgenbestrahlung und „Rekombination im Männchen“) keine Deletionen lieferten, die die Bereiche der Lücken überlappend abdeckten oder einen Mesodermwanderungsdefekt zeigten. Da die Größen dieser Deletionen nicht bestimmt wurden, konnte auf diesem Weg keine Aussage über die Lokalisation der für die Mesodermwanderung notwendigen Gene getroffen werden (Gryzik, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode der „FRT-vermittelten Rekombination“ besitzt gegenüber vorher erwähnten Methoden entscheidende Vorteile, die sich auch in den resultierenden Ergebnissen widerspiegeln. Durch die Auswahl der FRT-Konstrukte ist die Größe und Lokalisation der entstehenden Deletionen von vorne herein festgelegt. Mittels weniger Kreuzungen entstehen Fliegen, die zusammen mit der Deletion einen Selektionsmarker für die Augenfarbe tragen und somit leicht gesichtet werden können. Die Frequenz mit der solche Fliegen auftreten, ist abhängig von der Größe der Deletion (0,083-0,958%), liegt aber weit über den ermittelten Frequenzen für Röntgenbestrahlung (0,01-0,05%, Ashburner et al., 1982) und „Rekombination im Männchen“ (0,04%, Gryzik, 2000). Aber auch dieser Methode sind durch das Vorhandensein von haplo-insuffizienten Loci Grenzen gesetzt. Die größte Klasse stellen dabei die so genannten *Minute*-Mutationen dar.

Heterozygote Deletionen für *Minute*-Gene führen zu Fliegen, die ein breites Spektrum an Phänotypen ausprägen (z. B. verlängerte Entwicklungsdauer, kurze und dünne Borsten, reduzierte Fruchtbarkeit und Lebensdauer sowie rezessive Letalität) (Lindsley et al., 1972). Unabhängige Untersuchungen haben gezeigt, dass viele der *Minute*-Mutationen Gene betreffen, die für ribosomale Proteine kodieren (Saeboe-Larssen et al., 1998). Vier Deletionen in der Lücke der *prd*-Region, die den Bereich 34B6-34C3 abdecken, konnten nicht hergestellt werden, da die Fliegen, die die entsprechende Deletion tragen sollten, entweder wie in 2 Fällen nicht aufgetreten sind oder wie in 2 weiteren Fällen einen *Minute*-Phänotyp ausprägten, der zu einer erhöhten Sterilitätsrate führte. Dieser Defekt könnte auf dem Verlust des Genes *RpL24* (*Ribosomal protein L24*) beruhen. RpL24 ist in 34B10 lokalisiert und kodiert eine große ribosomale Untereinheit. RNAi-Experimente an Zelllinien haben gezeigt, dass dieses Gen für das Wachstum und die Überlebensrate der Zellen benötigt wird (Boutros et al., 2004).

Mit Hilfe der „FRT vermittelten Rekombination“ konnten für beide Bereiche Deletionen erzeugt werden, die nützliche Hinweise auf die Lokalisation der gesuchten zygotischen Gene lieferten. Die gesuchten Gene in der *en*-Region liegen in dem Bereich, der von der Defizienz *Df(2R)ED2238* abgedeckt wird. Hier trifft also die Hypothese zu, dass die gesuchten Gene innerhalb der Lücke lokalisiert sind. Schwieriger gestaltet sich die Auswertung für die gesuchten Gene oder das gesuchte Gen in der *prd*-Region. Embryonen des neu hergestellten Deletionstammes *Df(2L)ED784*, der über dem *SM6*-Balancerchromosom gehalten wird, zeigen einen Mesodermwanderungsdefekt, der den Defekt der synthetischen Defizienz phänokopiert. Sobald die Deletion über einem anderen Balancerchromosom gehalten wird, kann in den hieraus resultierenden Embryonen keine gestörte Mesodermwanderung mehr detektiert werden. Es kann ausgeschlossen werden, dass dieser Defekt nur in Embryonen auftritt, die homozygot für das *SM6*-Balancerchromosom sind, da ansonsten alle neu hergestellten Deletionslinien diesen Defekt zeigen würden. Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass es sich um einen maternalen Dosis-Effekt handelt, der sich ausprägt, wenn die Weibchen die Defizienz in trans zu dem *SM6*-Balancerchromosom tragen. Trotzdem ist es verwunderlich, dass die auftretenden Defekte denen der synthetischen Defizienz so ähnlich sind. Eine weitere Analyse ist notwendig, um zu entscheiden, ob die Defizienz *Df(2L)ED784* Gene enthält, die für den Prozess der Mesodermwanderung benötigt werden. Zu diesem Zeitpunkt kann also keine Aussage über die Lokalisation der gesuchten Gene in der *prd*-Region getroffen werden.

4.2 Die Identifizierung neuer Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in *Drosophila*

Eine schnelle Identifikation der für die Mesodermwanderungsdefekte verantwortlichen Gene innerhalb der Defizienz *Df(2R)ED2238* wurde durch den Vergleich von verfügbaren Expressionsdaten aller in Frage kommenden Gene erleichtert. Beispielsweise sind Expressionsdaten von ca. 70% aller *Drosophila*-Gene in Form von in-situ-Hybridisierungen und Mikroarray-Profilen veröffentlicht (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl). Beide Datensätze wurden unabhängig voneinander gewonnen. Das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Hybridisierungssonden stellt die für *Drosophila* vorhandene Kollektion von cDNAs dar. Für die Mikroarray-Expressionsprofile dagegen wurden neuartige Chipdatensätze angefertigt, bei welchen die Oligonukleotid-Proben auf der Basis der Genomsequenz synthetisiert wurden und damit unabhängig von existierenden cDNA-Klonen sind (Tomancak et al., 2002). Aufgrund dieser Vorgehensweise stehen für einzelne Gene manchmal nur Hybridisierungs- oder Mikroarray-Daten zur Verfügung. Für die Mikroarray-Analyse wurde die Embryogenese in 12 Zeitabschnitte von je einer Stunde unterteilt und für jeden Zeitabschnitt wurden Gesamt-RNA präpariert. Diese Art der Analyse erlaubt Rückschlüsse auf die Expression der Gene während der verschiedenen Stadien der Entwicklung. Der einzige Nachteil dieser Methode besteht darin, dass nicht alle Gene in dieser Datenbank erfasst sind. Mit Hilfe dieser Datenbank wurde die Expression der 14 Kandidatengene in der Defizienz *Df(2R)ED2238* untersucht. Hierbei erwies es sich als Vorteil, dass der gewählte genetische Ansatz nur Phänotypen aufdeckt, die durch den Verlust der zygotischen Genfunktion entstehen.

Die Bestätigung der Expressionsdaten durch eine Northern-Blot-Analyse ergab, dass die Annotierung von *CG12443* und *CG13194* nicht vollständig sein konnte. Die Größe der detektierten Transkripte weicht von der vorhergesagten Transkriptlänge ab. Zur Identifizierung von Protein-kodierenden Genen im *Drosophila*-Genom werden hauptsächlich drei Standardansätze verwendet: [1] Die Annotierungen erfolgen durch Computerprogramme, die aufgrund der vorliegenden genomischen Sequenz Gene vorhersagen können (GenScan und Genie, Burge und Karlin, 1997; Reese et al., 2000). [2] Durch Sequenzvergleiche von existierenden ESTs (Expressed Sequences Tag) und cDNAs mit der Genomsequenz können Gene vorhergesagt werden (Sim4, Florea et al., 1998), wobei [3] auch Peptide, ESTs und cDNAs aus anderen Organismen verwendet werden können, um konservierte Gene im Genom von *Drosophila* zu finden (Übersichtsartikel, Mungall et al., 2002). Dass die hierbei annotierten Gene oftmals nicht vollständig sind, zeigt sich nach jeder

Überarbeitung der Annotierung in der ständig wachsenden Zahl von Exons. Während die Gesamtzahl der Protein-kodierenden Gene mit einer Anzahl von 13.600 ungefähr konstant geblieben ist, erhöhte sich die Anzahl der Exons, die in der 2. Fassung der *Drosophila*-Genomsequenz noch 54.793 betrug, auf 60.897 in der 3. Fassung (Misra et al., 2002). Wenn wie im vorliegenden Fall keine vollständigen cDNA-Klone existieren, die die computergestützten Vorhersagen bestätigen, kann vermutet werden, dass diese Gene unvollständig annotiert sind. Diese Tatsache hat auch dazu geführt, dass die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, obwohl sie in vielen Organismen konserviert sind, nicht durch Protein-Blast-Analysen identifiziert werden konnten.

Um zu beweisen, dass es sich bei *FGF8-like1* und *FGF8-like2* tatsächlich um diejenigen Gene handelt, deren Verlust in der Defizienz *Df(2R)ED2238* zur Ausprägung des Mesodermwanderungsdefektes führt, muss die Genfunktion beider Gene ausgeschaltet werden und der resultierende Phänotyp mit dem Phänotyp der Defizienz verglichen werden. Da es aufgrund der überlappenden Expressionsdomänen im frühen Embryo durchaus möglich ist, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* gemeinsam agieren, und da zunächst noch keine Einzelmutanten vorlagen, wurde zu Klärung dieser Frage die Methode der RNA-Interferenz angewendet. Die Methode der RNAi ermöglicht es, durch Injektion von doppelsträngiger RNA, die Funktion zweier Gene gleichzeitig zu blockieren, die eine redundante Funktion während der Entwicklung ausüben (Kennerdell und Carthew, 1998). Da bei der Injektion die Embryonen teilweise zu stark beschädigt werden, entwickelt sich ein Teil der Embryonen nicht oder zeigt Defekte, die nicht durch den Verlust der spezifischen Genfunktion entstehen. In den vorliegenden Untersuchungen können derartige Defekte ausgeschlossen werden, da die Auswertung der injizierten Embryonen durch eine Antikörperfärbung gegen das Eve-Protein erfolgte. Die Detektierung der *eve*-Expression im Nervensystem zeigt, dass sich die Embryonen normal entwickelt haben müssen. Gleichzeitig ist es durch den Verlust der Eve-Färbung in den Perikardialzellen möglich Mesodermwanderungsdefekte in den injizierten Embryonen aufzudecken. Die beobachteten Defekte resultieren demnach aus dem Funktionsverlust von *FGF8-like1* und *FGF8-like2*. Zusätzliche Untersuchungen auf zellulärer Ebene in *FGF8-like1*- und *FGF8-like2*-mutanten Embryonen zeigten, dass die Mesodermzellen keine Zellformveränderungen ausprägen (vgl. 4.3).

Alle Daten zusammen sprechen dafür, dass es sich bei *FGF8-like1* und *FGF8-like2* um die gesuchten Gene innerhalb der synthetischen Deletion handelt.

4.3 FGF8-like1 und FGF8-like2: Liganden für den Htl-Rezeptor

Die Mitglieder der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-Familie weisen sich durch den Besitz einer ca. 120aa großen, konservierten FGF-Kerndomäne aus. Diese Kerndomäne weist neben Glykolisierungs-, Phosphorylierungs- und Ribosylierungsstellen auch eine Region auf, die für die Bindung von Glycosaminoglykanen und die Rezeptorbindung notwendig ist. Viele, aber nicht alle FGF-Liganden besitzen zusätzlich ein N-terminales Signalpeptid. (Szebenyi und Fallon, 1999). Eine SMART-Analyse (Schultz et al., 1998) von FGF8-like1 und FGF8-like2 hat das Vorhandensein einer solchen FGF-Kerndomäne in beiden Proteinen bestätigt. Ebenso besitzen beide Proteine ein N-terminales Signalpeptid, was dafür spricht, dass beide Proteine sekretiert werden und damit extrazellulär wirken. Aufgrund der Proteinsequenzen wird deutlich, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* für neue Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in *Drosophila* kodieren. Die FGF-Kerndomänen von FGF8-like1 und FGF8-like2 zeigen in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz eine Identität von 39%. Bei einer Datenbanksuche nach verwandten Proteinen in anderen Spezies weisen Vertebraten-Proteine aus der FGF8/17/18-Unterfamilie innerhalb der Kerndomäne die höchsten Homologien auf. Interessanterweise kontrollieren viele FGF-Signalmoleküle aus der FGF8/17/18-Unterfamilie sowohl Zellmigrations- als auch Differenzierungsprozesse. Die Zugehörigkeit von FGF8-like1 und FGF8-like2 zur *FGF8/17/18*-Unterfamilie und der mutante Phänotyp lieferten erste Hinweise auf ihre Funktion zur Aktivierung des Htl-Rezeptors während des Migrationsprozesses (vgl. 4.5).

In *Drosophila* gibt es zwei FGF-Rezeptor-Homologe, die Rezeptor-Tyrosinkinasen Heartless und Breathless. Der Ligand für Breathless wird von dem Gen *branchless* kodiert, das außer *FGF8-like1* und *FGF8-like2* das einzige FGF-Homolog in *Drosophila* darstellt. In *breathless*- oder *branchless*-mutanten Embryonen ist die primäre Verzweigung der Tracheen gestört (Klämbt et al., 1992; Sutherland et al., 1996). Schon das Expressionsmuster und der mutante Phänotyp von *branchless* weisen darauf hin, dass Branchless nicht als Ligand für den Heartless-Rezeptor agieren kann. *Branchless*-Expression zeigt sich in der frühen Embryogenese (Stadium 5-8) nur im Bereich der Kopffurche und beschränkt sich später auf diejenigen Gewebe, die das sich entwickelnde Tracheensystem umgeben (Sutherland et al., 1996). *Heartless* ist im Mesoderm ab Stadium 5 exprimiert. Diese Expression bleibt während der Embryogenese erhalten und ist auch noch in den Vorläuferzellen des viszeralen Mesoderms, des Herzens und der somatischen Muskulatur zu finden (Beiman et al., 1996). Selbst wenn *branchless* im Ektoderm überexprimiert wird, kann keine ektopische Aktivierung des Htl-Signalweges detektiert werden (Reichman-Fried und Shilo, 1995).

Die frühe Expression von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* ist auf das neurogene Ektoderm begrenzt, welches das Substrat für die wandernden Mesodermzellen darstellt und als potentieller Ursprung des Liganden postuliert wurde (Gabay et al., 1997; Michelson et al., 1998). Da beide Proteine ein N-terminales Signalpeptid besitzen und daher wahrscheinlich sekretiert werden, ist eine Interaktion mit dem Heartless-Rezeptor, der ausschließlich im Mesoderm exprimiert wird, möglich. Wenn Proteine ihre Funktion im gleichen Signalweg ausüben, prägen Mutationen in den entsprechenden Genen oftmals den gleichen Phänotyp aus. Dementsprechend phänokopiert die Deletion von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* alle Defekte *htl*-mutanter Embryonen in Bezug auf die Mesodermwanderung, die Spezifizierung der Perikardialzellen sowie die Aktivierung der MAP-Kinase. Die Ausschaltung der Genfunktion von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* durch RNAi konnte desweiteren zeigen, dass in den injizierten Embryonen keine *htl*-abhängigen Zellformveränderungen stattfinden. Das Modell einer Signalkette, in der Heartless von FGF8-like1 und FGF8-like2 aktiviert wird, wird auch durch die durchgeführten Rettungsexperimente unterstützt. Der mutante Phänotyp von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* kann durch die Überexpression eines konstitutiv aktiven Htl-Rezeptors teilweise gerettet werden, was bedeutet, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* epistatisch zu *heartless* sind. Viele der hier aufgeführten Ergebnisse wurden durch die zeitgleichen Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Stathopoulos et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FGF8-like1 und FGF8-like2 die Liganden des FGF-Rezeptors Heartless sind.

4.4 Gemeinsame und divergierende Funktionen von FGF8-like1 und FGF8-like2 während der frühen Entwicklung

FGF8-like1 und *FGF8-like2* sind während der Evolution wahrscheinlich durch eine ca. 50 kb große Tandemduplikation aus einem einzelnen Vorläufergen entstanden (Stathopoulos et al., 2004). Die Mücke *Anopheles gambia* besitzt nur ein einzelnes *FGF*-Gen, das näher mit *FGF8-like1* verwandt ist, während *Drosophila pseudoobscura* und *Drosophila melanogaster* jeweils 2 mit *FGF8-like1* und *FGF8-like2* verwandte *FGF*-Gene besitzen. Aus Duplikationen entstandene Gene kodieren oftmals für Proteine mit ähnlichen Funktionen. So lässt die Ähnlichkeit der frühen Expressionsmuster von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* vermuten, dass ihre Funktionen während der frühen Gastrulation teilweise redundant sind. Ihre selektive Expression im Neuroektoderm wird unter anderem vermutlich durch das Zusammenspiel des Repressors Snail und des Transkriptionsfaktors Dorsal kontrolliert. Für *FGF8-like1* konnte

gezeigt werden, dass der im 2. Intron gelegene Enhancer drei Dorsal-Bindungsstellen und eine Snail-Bindungsstelle enthält (Stathopoulos et al., 2002). Der Snail-Repressor ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die Expression von *FGF8-like1* im Mesoderm reprimiert wird. Ein vergleichbarer Enhancer ist für *FGF8-like2* noch nicht isoliert worden, vermutlich ähnelt er aber im Aufbau dem beschriebenen Enhancer von *FGF8-like1*.

Nach der Invagination des Mesoderms wird Heartless für die korrekte Interaktion des Mesoderms mit dem Ektoderm und die damit verbundenen Zellformveränderungen der Mesodermfrontzellen benötigt (Schumacher et al., 2004). Die zu diesem Zeitpunkt gleichartige Expression von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* spricht dafür, dass beide Gene in den frühen Stadien der Wanderung eine redundante, permissive Funktion ausüben, die den Mesodermzellen durch die Aktivierung des Heartless-Rezeptors eine Ausbreitung ermöglicht. Auch die frühe, lokale Aktivierung der MAP-Kinase in denjenigen Mesodermzellen, die in Kontakt mit dem Ektoderm stehen, unterstützt diese Annahme. In späteren Stadien der Wanderung ist die Aktivierung der MAP-Kinase ausschließlich in den Frontzellen des wandernden Mesoderms zu finden (Gabay et al., 1997). Da *heartless* in allen mesodermalen Zellen exprimiert wird, wurde postuliert, dass die potentiellen Liganden einen Gradienten entlang der dorso-ventralen Achse bilden. Zu diesem Zeitpunkt wird *FGF8-like1* noch gleichmäßig im Neuroektoderm exprimiert, während die Expression von *FGF8-like2* in den ventralen und lateralen Bereichen des Ektoderms herunterreguliert wurde und nur noch in den dorsalen Ektodermzellen zu finden ist. Diese Expressionsdaten sprechen dafür, dass *FGF8-like2* in den späteren Stadien der Wanderung eine instruktive Funktion ausüben könnte.

Die Analyse von *FGF8-like2*-mutanten Embryonen in Bezug auf die Mesodermwanderung hat ergeben, dass die 1. Klasse der Embryonen ein vollständiges Eve-Muster in den Perikardialzellen aufweist. Diese Beobachtung bestätigt nicht nur die redundante Funktion der beiden *FGF*-Gene während der frühen Wanderungsprozesse, sondern deutet auch darauf hin, dass die Funktion von *FGF8-like1* den Ausfall von *FGF8-like2* auch in Bezug auf ein instruktives Signal kompensieren kann. Da bislang keine Daten über die Proteinlokalisierung der Liganden vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verteilung von *FGF8-like1* einen Gradienten im Ektoderm ausbildet und somit ein instruktives Signal erzeugt. Es ist denkbar, dass die Ausbildung eines solchen Gradienten auf posttranskriptioneller Ebene kontrolliert wird. Die 2. Klasse von *FGF8-like2*-mutanten Embryonen bildet keine oder nur wenige Eve-positive Zellgruppen aus und daher muss auch *FGF8-like2* eine wichtige Funktion während der Mesodermmigration spielen. Die starke Expressivität des mutanten Phänotyps könnte auf einem Dosiseffekt von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* beruhen. Dabei

würde es keine Rolle spielen, welcher der beiden Liganden exprimiert ist, sondern nur, dass ein gewisser Schwellenwert an Ligandenkonzentration überschritten wird, um die korrekte Mesodermwanderung zu gewährleisten. In *FGF8-like2*-mutanten Embryonen existieren noch 2 Kopien von *FGF8-like1*. Die daraus resultierende Ligandenkonzentration könnte noch im Bereich des Schwellenwertes liegen und daher zu unterschiedlichen Ausprägungen des Phänotyps führen. Ein solches Modell kann mit einer Einzelmutante von *FGF8-like1* getestet werden. Wenn beide *FGF*-Gene in Heterozygose vorliegen, müssten sich in den Embryonen die gleichen Defekte zeigen, die auch in den jeweiligen Einzelmutanten beobachtet werden können.

Damit FGFs effektiv an einen FGF-Rezeptor binden können, müssen sie mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGS) interagieren. Diese Interaktion resultiert in der Formation von FGF-Dimeren und höher strukturierten FGF-Oligomeren (Ornitz und Itoh, 2001). Genetische Studien haben gezeigt, dass Mutationen in Enzymen, die an der Heparansulfat-Biosynthese beteiligt sind, die FGF-Signaltransduktion beeinflussen (Garcia-Garcia und Anderson, 2003; Lin et al., 1999). *FGF8-like1* und *FGF8-like2* scheinen Dimere bilden zu können (Itoh und Ornitz, 2004) und könnten daher durch verschiedene Homo- und Heterodimere die Aktivität des Heartless-Rezeptors differentiell regulieren. Es wäre denkbar, dass eine optimale Aktivierung des Heartless-Rezeptors nur dann erfolgt, wenn er ein Heterodimer bindet, das aus *FGF8-like1* und *FGF8-like2* besteht. Wenn die Funktion von *FGF8-like2* durch eine Nullmutation ausgeschaltet ist, könnten ausschließlich Homodimere von *FGF8-like1* gebildet werden. Die dadurch reduzierte Aktivität des Rezeptors würde dann zu den beobachteten Phänotypen führen.

Der Heartless-Rezeptor reguliert nicht nur den Wanderungsprozess der Mesodermzellen, er wird später auch für die Spezifizierung der dorsalen Mesodermderivate benötigt, aus denen die Perikardialzellen hervorgehen (Carmena et al., 2002; Michelson et al., 1998). Die Überexpression von *FGF8-like1* im Mesoderm oder Ektoderm führt dazu, dass die Anzahl der Eve-positiven Zellen erhöht ist (Stathopoulos et al., 2004). Es ist also wahrscheinlich, dass nicht nur der Wanderungsprozess, sondern auch die Differenzierung des Mesoderms durch *FGF8-like1* und *FGF8-like2* kontrolliert wird. Interessanterweise scheint auch die Anzahl der Perikardialzellen von der Ligandenkonzentration abhängig zu sein.

Die Interaktion von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* mit dem Heartless-Rezeptor beschränkt sich vermutlich nicht auf die Wanderung und Differenzierung des Mesoderms. Eine kürzlich durchgeführte Mikroarray-Analyse hat gezeigt, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* in den Muskelvorläuferzellen der Flügelimaginalscheibe exprimiert werden, wo auch Transkripte

von *heartless* nachgewiesen werden konnten (Butler et al., 2003). Auch die Migration und Fusion der viszeralen Muskelvorläuferzellen scheint von der Interaktion von FGF8-like1 und FGF8-like1 mit dem Heartless-Rezeptor abhängig zu sein (Mandal et al., 2004). *Heartless* ist in diesen Zellen exprimiert und in *htl*-mutanten Embryonen ist die Organisation des viszeralen Mesoderms gestört (Beiman et al., 1996; Shishido et al., 1997). Für *FGF8-like1* konnte kürzlich gezeigt werden, dass es ebenfalls auch in den viszeralen Muskelvorläuferzellen exprimiert wird (Klingseisen, 2005; Stathopoulos et al., 2004).

Es bleibt zu klären, inwieweit beide Liganden an den jeweiligen Prozessen beteiligt sind. *FGF8-like2* scheint nach den bisherigen Ergebnissen eine weniger bedeutende Rolle in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* zu spielen. So kann *FGF8-like1* in Ausnahmefällen die Funktion von FGF8-like2 für die gesamte Entwicklung bis zum adulten Tier kompensieren, da lebensfähige *FGF8-like2*-mutante Fliegenauftreten. Diese Fliegen weisen allerdings Abnormalitäten auf. So sind ihre Lebensdauer und Fertilität reduziert und sie weisen Defekte in den Flügeln auf. Die Funktion von FGF8-like2 in den Flügeln scheint jedoch nicht vom Htl-Rezeptor vermittelt zu werden, da sich die Expression von *heartless* in der Flügelimaginalscheibe auf die adepthelialen Zellen beschränkt, die sich später zu adulter Muskulatur entwickeln (Sato und Kornberg, 2002). Eine genauere Untersuchung der *FGF8-like2*-mutanten Fliegen könnte zusätzliche Defekte aufdecken.

4.5 Die frühe FGF-regulierte Entwicklung in anderen Organismen

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren regulieren viele Entwicklungsprozesse, einschließlich der neuralen Entwicklung, der Entwicklung von Herz- und Muskelzellen, der Angiogenese und der Gliedmaßenentwicklung (Szebenyi und Fallon, 1999). Auch während der Gastrulation in Vertebraten spielen FGFs eine wichtige Rolle. Auffällig dabei ist, dass die Regulation dieses Prozesses oftmals von mehreren FGF-Liganden abhängig ist. In der frühen Maus-Gastrula werden *Fgf4* und *Fgf8* für die Migration der Epiblastzellen aus dem Primitivstreifen benötigt und sind damit mitverantwortlich für die Bildung von mesodermalen und endodermalen Geweben. Beide Gene werden im Primitivstreifen co-exprimiert, wobei die Expression von *Fgf4* abhängig von *Fgf8* ist (Sun et al., 1999). Während der Entwicklung des Hühnchen-Embryos werden *Fgf4* und *Fgf8* im Primitivstreifen exprimiert und zeigen ein teilweise überlappendes Expressionsmuster. Bei der Migration der Epiblastzellen aus dem Primitivstreifen wirkt FGF8 als Repellent und FGF4 als Attraktant (Yang et al., 2002). Die

FGF-vermittelte Regulation von Zellmigrationsprozessen kann also sowohl durch Attraktion als auch durch Repulsion kontrolliert werden.

Im Zebrafisch führt die Überexpression einer dominant-negativen Form des FGF-Rezeptors zum Verlust des posterioren Mesoderms (Griffin et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass zwei miteinander verwandte FGFs (*fgf8* und *fgf24*), die Mitglieder der FGF8/17/18-Unterfamilie sind und im Zebrafisch auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind, zusammen für die Bildung des posterioren Mesoderms benötigt werden (Draper et al., 2003). Zusätzlich wird die Funktion von FGF8 für die Entwicklung der Herzvorläuferzellen benötigt, indem FGF8 die Expression von Herz-spezifischen Genen reguliert (Reifers et al., 2000). Wie gezeigt, sind *FGF8-like1* und *FGF8-like2* in *Drosophila melanogaster* nicht nur für die Migration der Mesodermzellen sondern auch für die Deteminierung des dorsalen Mesoderms zu Herzvorläuferzellen notwendig. Hier zeigt sich, dass die Funktionen des FGF8-Signalweges während der frühen Entwicklung in vielen Organismen bis hin zum Säugetier sehr ähnlich sind. Da die Gastrulation ein fundamentaler Prozess während der Entwicklung ist, stärkt die Kontrolle durch mehrere FGFs dabei wahrscheinlich die „Robustheit“ des Systems, das damit weniger anfällig auf Mutationen reagiert.

Auch in anderen Invertebraten werden Zellmigrationsprozesse durch den FGF-Signalweg reguliert. In *Caenorhabditis elegans* fungiert das FGF-Protein EGL-17 als Attraktant, das den Geschlechtsmyoblasten durch die Aktivierung des EGL-15-Rezeptors die Wanderung in die Gonade ermöglicht (Burdine et al., 1998). Während Mutationen in *egl-17* nur die Migration der Geschlechtsmyoblasten beeinträchtigen, zeigen Mutationen in *egl-15* in Abhängigkeit vom betrachteten Allel zusätzlich einen larvalen Arrest, eine veränderte Körpermorphologie und Defekte in der Wanderung bestimmter Axone (Birnbaum et al., 2005; Borland et al., 2001). Das FGF-Protein LET-756 scheint die Aktivität von EGL-15 für diese zusätzlichen Funktionen zu regulieren, da Mutationen in *let-765* entsprechende Defekte mit Ausnahme der Geschlechtsmyoblasten-Wanderung ausprägen (Roubin et al., 1999). Verschiedene FGF-Liganden für den gleichen Rezeptor werden also nicht nur verwendet, um durch Redundanz einen Prozess weniger anfällig für Mutationen zu machen, sondern auch um während der Entwicklung unterschiedliche Funktionen auszuüben. Inwieweit dieses auch für *FGF8-like1* und *FGF8-like2* zutrifft, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Einen ersten entsprechenden Hinweis geben die klar voneinander trennbaren Expressionsmuster beider Gene im späten Embryo, in den Imaginalscheiben und im Ovar (Klingseisen, 2005; Stathopoulos et al., 2004).

4.6 Ausblick

Ein vorrangiges Ziel der weiterführenden Arbeiten stellt die Funktionsanalyse von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* während der Mesodermmigration dar. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, auch eine Einzelmutante von *FGF8-like1* zu erzeugen. Die hierdurch neu gewonnenen Erkenntnisse würden ein präziseres Bild über die Regulation der Mesodermwanderung durch den FGF-Signalweg liefern. Auch eine Ausweitung der bereits begonnenen Überexpressionsstudien und die damit verbundene Herstellung eines UAS-Konstruktes von *FGF8-like2* sind für eine Funktionsanalyse hilfreich. Die in der Herstellung befindlichen und wahrscheinlich bald verfügbaren Antikörper gegen *FGF8-like1* und *FGF8-like2* werden Aussagen über die Proteinmuster und damit die Überprüfung der Gradientenhypothese ermöglichen. Alle diese Daten werden dazu beitragen, ein geeignetes Modell für die FGF-vermittelte Wanderung des Mesoderms zu erstellen.

Mit oben genannten Hilfsmitteln können dann auch die späteren Funktionen von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* während der Entwicklung untersucht werden. Die hierfür notwendige Analyse der Expressionsmuster im Embryo, in den Imaginalscheiben und im Ovar ist bereits durchgeführt worden (Klingseisen, 2005). Eine Untersuchung der späten Funktionen wird zeigen, inwieweit *FGF8-like1* und *FGF8-like2* gemeinsame und divergierende Funktionen während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* ausüben.

5 Zusammenfassung

Die Mesodermwanderung in *Drosophila* ist abhängig von der Aktivität des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors Heartless (Htl). Htl wird durch die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade für die Interaktion der Mesodermzellen mit dem Ektoderm und für die Bildung von zellulären Ausläufern in den wandernden Mesodermzellen benötigt. Es war nicht bekannt durch welches Signal der Htl-Rezeptor aktiviert wird. Durch einen genetischen Ansatz, der 99% des *Drosophila*-Genoms abdeckt, konnten sieben Regionen identifiziert werden, die für die Mesodermwanderung benötigt werden.

Die vorliegende Arbeit präsentiert die phänotypische Analyse sowie die molekulare Kartierung durch Deletionen von zwei dieser Regionen auf dem 2. Chromosom. Es stellte sich heraus, dass eine für die Kartierung neu hergestellte Deletion, die Defekte von *htl*-mutanten Embryonen phänokopiert. Innerhalb dieser Deletion konnten zwei Gene identifiziert werden, *FGF8-like1* und *FGF8-like2*, die neue FGF-Homologe aus der FGF8/17/18-Familie in *Drosophila* kodieren. Trotz einer unvollständigen Annotierung konnten von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* vollständige cDNA-Klone isoliert werden.

FGF8-like1 und *FGF8-like2* werden während der Gastrulation in den Zellen des Ektoderms exprimiert, die den wandernden Mesodermzellen als Substrat dienen. Es konnte gezeigt werden, dass beim Verlust der Genfunktion von *FGF8-like1* und *FGF8-like2* weder zelluläre Ausläufer in den wandernden Mesodermzellen gebildet werden noch eine Htl-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade stattfindet. Epistasie-Experimente ergaben, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* für die Aktivierung des Htl-Rezeptors benötigt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* die Liganden für den Htl-Rezeptor darstellen.

Die überlappende Expression beider Gene im Neuroektoderm während der Gastrulation deutete an, dass *FGF8-like1* und *FGF8-like2* eine redundante Funktion in der Regulation der Mesodermwanderung ausüben. Die Herstellung einer Einzelmutante für *FGF8-like1* konnte diese Vermutung teilweise bestätigen. Der genaue Mechanismus wie *FGF8-like1* und *FGF8-like2* die Bewegungen des Mesoderms koordinieren ist aber noch nicht geklärt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der FGF-Rezeptor Htl von zwei verschiedenen FGF-Liganden aktiviert wird, die während der Morphogenese des Mesoderms eine teilweise redundante Funktion ausüben könnten.

6 Literatur

- Ahmad, S. M. und Baker, B. S.** (2002). Sex-specific deployment of FGF signaling in *Drosophila* recruits mesodermal cells into the male genital imaginal disc. *Cell* **109**, 651-61.
- Ashburner, M., Aaron, C. S. und Tsubota, S.** (1982). The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster*, including the structural gene for alcohol dehydrogenase. V. Characterization of X-ray-induced Adh null mutations. *Genetics* **102**, 421-35.
- Battersby, A., Csiszar, A., Leptin, M. und Wilson, R.** (2003). Isolation of proteins that interact with the signal transduction molecule Dof and identification of a functional domain conserved between Dof and vertebrate BCAP. *J Mol Biol* **329**, 479-93.
- Beiman, M., Shilo, B. Z. und Volk, T.** (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* **10**, 2993-3002.
- Birnbaum, D., Popovici, C. und Roubin, R.** (2005). A pair as a minimum: the two fibroblast growth factors of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn* **232**, 247-55.
- Borland, C. Z., Schutzman, J. L. und Stern, M. J.** (2001). Fibroblast growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* **23**, 1120-30.
- Böttcher, R. T. und Niehrs, C.** (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* **26**, 63-77.
- Boutros, M., Kiger, A. A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S. A., Consortium, H. F., Paro, R. und Perrimon, N.** (2004). Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* **303**, 832-5.
- Bülow, H. E., Boulin, T. und Hobert, O.** (2004). Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron* **42**, 367-74.
- Burdine, R. D., Branda, C. S. und Stern, M. J.** (1998). EGL-17(FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in *C. elegans*. *Development* **125**, 1083-93.
- Burge, C. und Karlin, S.** (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* **268**, 78-94.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. und Simcox, A.** (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-70.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V.** (1997). "The embryonic development of *Drosophila melanogaster*." Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Carmena, A., Buff, E., Halfon, M. S., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., Baylies, M. K. und Michelson, A. M.** (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Biol* **244**, 226-42.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F. und Michelson, A. M.** (1998). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* **12**, 3910-22.
- Ciruna, B. und Rossant, J.** (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* **1**, 37-49.
- DiGabriele, A. D., Lax, I., Chen, D. I., Svahn, C. M., Jaye, M., Schlessinger, J. und Hendrickson, W. A.** (1998). Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature* **393**, 812-7.

- Draper, B. W., Stock, D. W. und Kimmel, C. B.** (2003). Zebrafish *fgf24* functions with *fgf8* to promote posterior mesodermal development. *Development* **130**, 4639-54.
- Dunin-Borkowski, O. M. und Brown, N. H.** (1995). Mammalian CD2 is an effective heterologous marker of the cell surface in *Drosophila*. *Dev Biol* **168**, 689-93.
- Edgar, B. A. und O'Farrell, P. H.** (1990). The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* **62**, 469-80.
- Florea, L., Hartzell, G., Zhang, Z., Rubin, G. M. und Miller, W.** (1998). A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res* **8**, 967-74.
- Frasch, M.** (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **374**, 464-7.
- Gabay, L., Seger, R. und Shilo, B. Z.** (1997). MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **124**, 3535-41.
- Garcia-Garcia, M. J. und Anderson, K. V.** (2003). Essential role of glycosaminoglycans in Fgf signaling during mouse gastrulation. *Cell* **114**, 727-37.
- Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M. M. und Krasnow, M. A.** (2003). Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 623-47.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q. und Michelson, A. M.** (1996). *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **10**, 3003-17.
- Golic, K. G. und Golic, M. M.** (1996). Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* **144**, 1693-711.
- Griffin, K., Patient, R. und Holder, N.** (1995). Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* **121**, 2983-94.
- Gryzik, T.** (2000). "Untersuchungen zur Mesodermzellwanderung in *Drosophila melanogaster*: Genetische Analyse zygotischer Loci auf dem zweiten Chromosom." Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf.
- Gryzik, T. und Müller, H. A.** (2004). FGF8-like1 and FGF8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor Htl and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Curr Biol* **14**, 659-67.
- Halfon, M. S., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Sackerson, C. M., Jimenez, F., Baylies, M. K. und Michelson, A. M.** (2000). Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* **103**, 63-74.
- Harbecke, R. und Lengyel, J. A.** (1995). Genes controlling posterior gut development in the *Drosophila* embryo. *Roux Archive of Developmental Biology* **204**, 308-329.
- Hunter, T.** (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-27.
- Ip, Y. T., Kraut, R., Levine, M. und Rushlow, C. A.** (1991). The dorsal morphogen is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts with a long-range repression element in *Drosophila*. *Cell* **64**, 439-46.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. und Levine, M.** (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1518-30.
- Itoh, N. und Ornitz, D. M.** (2004). Evolution of the *Fgf* and *Fgfr* gene families. *Trends Genet* **20**, 563-9.
- Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T. und Levine, M.** (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **5**, 1881-91.

- Kam, Z., Minden, J. S., Agard, D. A., Sedat, J. W. und Leptin, M.** (1991). *Drosophila* gastrulation: analysis of cell shape changes in living embryos by three-dimensional fluorescence microscopy. *Development* **112**, 365-70.
- Kennerdell, J. R. und Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Klämbt, C., Glazer, L. und Shilo, B. Z.** (1992). *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* **6**, 1668-78.
- Klingseisen, A.** (2005). "Untersuchungen zur Expression und Funktion von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*." Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf.
- Knust, E. und Müller, H.** (1998). *Drosophila* morphogenesis: orchestrating cell rearrangements. *Curr Biol* **8**, R853-5.
- Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. und Schlessinger, J.** (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**, 693-702.
- Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-69.
- Lawson, A., Colas, J. F. und Schoenwolf, G. C.** (2001). Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the avian primitive streak. *Anat Rec* **262**, 221-6.
- Leptin, M.** (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* **5**, 1568-76.
- Leptin, M. und Grunewald, B.** (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* **110**, 73-84.
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. und Michelson, A. M.** (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* **126**, 3715-23.
- Lindsley, D. L., Sandler, L., Baker, B. S., Carpenter, A. T., Denell, R. E., Hall, J. C., Jacobs, P. A., Miklos, G. L., Davis, B. K., Gethmann, R. C., Hardy, R. W., Steven, A. H., Miller, M., Nozawa, H., Parry, D. M. und Gould-Somero, M.** (1972). Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome. *Genetics* **71**, 157-84.
- Mandal, L., Dumstrei, K. und Hartenstein, V.** (2004). Role of FGFR signaling in the morphogenesis of the *Drosophila* visceral musculature. *Dev Dyn* **231**, 342-8.
- Michelson, A. M., Gisselbrecht, S., Zhou, Y., Baek, K. H. und Buff, E. M.** (1998). Dual functions of the *heartless* fibroblast growth factor receptor in development of the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Genet* **22**, 212-29.
- Misquitta, L. und Paterson, B. M.** (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1451-6.
- Misra, S., Crosby, M. A., Mungall, C. J., Matthews, B. B., Campbell, K. S., Hradecky, P., Huang, Y., Kaminker, J. S., Millburn, G. H., Prochnik, S. E., Smith, C. D., Tupy, J. L., Whitfield, E. J., Bayraktaroglu, L., Berman, B. P., Bettencourt, B. R., Celniker, S. E., de Grey, A. D., Drysdale, R. A., Harris, N. L., Richter, J., Russo, S., Schroeder, A. J., Shu, S. Q., Stapleton, M., Yamada, C., Ashburner, M., Gelbart, W. M., Rubin, G. M. und Lewis, S. E.** (2002). Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0083.

- Müller, H.-A. J., Samanta, R. und Wieschaus, E.** (1999). Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: zygotic requirements and the role of the *frizzled* genes. *Development* **126**, 577-86.
- Mungall, C. J., Misra, S., Berman, B. P., Carlson, J., Frise, E., Harris, N., Marshall, B., Shu, S., Kaminker, J. S., Prochnik, S. E., Smith, C. D., Smith, E., Tupy, J. L., Wiel, C., Rubin, G. M. und Lewis, S. E.** (2002). An integrated computational pipeline and database to support whole-genome sequence annotation. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0081.
- Oda, H. und Tsukita, S.** (1999). Dynamic features of adherens junctions during *Drosophila* embryonic epithelial morphogenesis revealed by a Dalpha-catenin-GFP fusion protein. *Dev Genes Evol* **209**, 218-25.
- Oda, H., Tsukita, S. und Takeichi, M.** (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* **203**, 435-50.
- Ornitz, D. M., Herr, A. B., Nilsson, M., Westman, J., Svahn, C. M. und Waksman, G.** (1995). FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science* **268**, 432-6.
- Ornitz, D. M. und Itoh, N.** (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M. und Leder, P.** (1992). Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* **267**, 16305-11.
- Park, M., Wu, X., Golden, K., Axelrod, J. D. und Bodmer, R.** (1996). The *wingless* signaling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev Biol* **177**, 104-16.
- Perris, R. und Perissinotto, D.** (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech Dev* **95**, 3-21.
- Petit, V., Nussbaumer, U., Dossenbach, C. und Affolter, M.** (2004). Downstream-of-FGFR is a fibroblast growth factor-specific scaffolding protein and recruits Corkscrew upon receptor activation. *Mol Cell Biol* **24**, 3769-81.
- Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R. und Mohammadi, M.** (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**, 641-50.
- Preston, C. R., Sved, J. A. und Engels, W. R.** (1996). Flanking duplications and deletions associated with P-induced male recombination in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 1623-38.
- Reese, M. G., Kulp, D., Tammana, H. und Haussler, D.** (2000). Genie--gene finding in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **10**, 529-38.
- Reichman-Fried, M. und Shilo, B. Z.** (1995). Breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation. *Mech Dev* **52**, 265-73.
- Reifers, F., Walsh, E. C., Leger, S., Stainier, D. Y. und Brand, M.** (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (*fgf8/acerebellar*). *Development* **127**, 225-35.
- Ribeiro, C., Ebner, A. und Affolter, M.** (2002). In vivo imaging reveals different cellular functions for FGF and Dpp signaling in tracheal branching morphogenesis. *Dev Cell* **2**, 677-83.
- Roth, S., Stein, D. und Nusslein-Volhard, C.** (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189-202.
- Roubin, R., Naert, K., Popovici, C., Vatcher, G., Coulier, F., Thierry-Mieg, J., Pontarotti, P., Birnbaum, D., Baillie, D. und Thierry-Mieg, D.** (1999). *let-756*, a *C. elegans* *fgf* essential for worm development. *Oncogene* **18**, 6741-7.

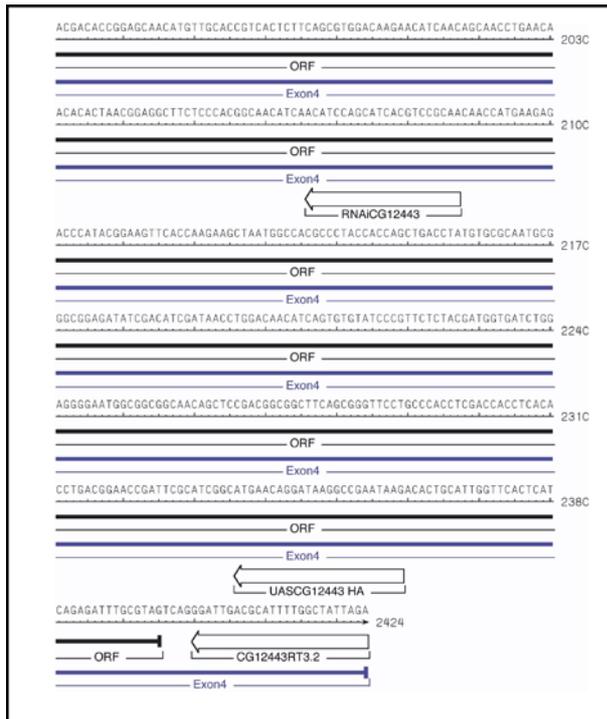
- Rushlow, C., Frasch, M., Doyle, H. und Levine, M.** (1987). Maternal regulation of *zerknüllt*: a homoeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in *Drosophila*. *Nature* **330**, 583-6.
- Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L. und Levine, M.** (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* **59**, 1165-77.
- Saeboe-Larssen, S., Lyamouri, M., Merriam, J., Oksvold, M. P. und Lambertsson, A.** (1998). Ribosomal protein insufficiency and the minute syndrome in *Drosophila*: a dose-response relationship. *Genetics* **148**, 1215-24.
- Santos, A. C. und Lehmann, R.** (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr Biol* **14**, R578-89.
- Sato, M. und Kornberg, T. B.** (2002). FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the *Drosophila* tracheal system. *Dev Cell* **3**, 195-207.
- Saxton, T. M. und Pawson, T.** (1999). Morphogenetic movements at gastrulation require the SH2 tyrosine phosphatase Shp2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3790-5.
- Schlessinger, J. und Bar-Sagi, D.** (1994). Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 173-9.
- Schlessinger, J., Lax, I. und Lemmon, M.** (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* **83**, 357-60.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.
- Schumacher, S., Gryzik, T., Tannebaum, S. und Muller, H. A.** (2004). The RhoGEF Pebble is required for cell shape changes during cell migration triggered by the *Drosophila* FGF receptor Heartless. *Development* **131**, 2631-40.
- Shamim, H. und Mason, I.** (1999). Expression of *Fgf4* during early development of the chick embryo. *Mech Dev* **85**, 189-92.
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T. und Saigo, K.** (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* **124**, 2119-28.
- Staebling, H. K., Hoffmann, F. M., Baylies, M. K., Rushton, E. und Bate, M.** (1994). *dpp* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* **372**, 783-6.
- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M. und Levine, M.** (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **18**, 687-99.
- Stathopoulos, A., Van Drenth, M., Erives, A., Markstein, M. und Levine, M.** (2002). Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* **111**, 687-701.
- Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M. und Martin, G. R.** (1999). Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* **13**, 1834-46.
- Sutherland, D., Samakovlis, C. und Krasnow, M. A.** (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091-101.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M. und Wieschaus, E.** (1991). Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development* **112**, 775-89.
- Szebenyi, G. und Fallon, J. F.** (1999). Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* **185**, 45-106.

- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S. E. und Rubin, G. M.** (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0088.
- Venkataraman, G., Sasisekharan, V., Herr, A. B., Ornitz, D. M., Waksman, G., Cooney, C. L., Langer, R. und Sasisekharan, R.** (1996). Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 845-50.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M. und Leptin, M.** (1998). The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling. *Mol Cell* **2**, 515-25.
- Weijer, C. J.** (2004). *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 392-8.
- Wilson, R., Battersby, A., Csiszar, A., Vogelsang, E. und Leptin, M.** (2004a). A functional domain of Dof that is required for fibroblast growth factor signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 2263-76.
- Wilson, R. und Leptin, M.** (2000). Fibroblast growth factor receptor-dependent morphogenesis of the *Drosophila* mesoderm. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 891-5.
- Wilson, R., Vogelsang, E. und Leptin, M.** (2004b). FGF signaling and the mechanism of mesoderm spreading in *Drosophila* embryos. *Development* **132**, 491-501.
- Wu, X., Golden, K. und Bodmer, R.** (1995). Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene *wingless*. *Dev Biol* **169**, 619-28.
- Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M. und Rossant, J.** (1994). *fgfr-1* is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* **8**, 3032-44.
- Yang, X., Dormann, D., Munsterberg, A. E. und Weijer, C. J.** (2002). Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell* **3**, 425-37.

7 Anhang



Anhang1: Die cDNA von *FGF8-like1*
 Legende auf der nächsten Seite.

Anhang1: Die cDNA von *FGF8-like1*

Die durch RT-PCR klonierte cDNA von *FGF8-like1* setzt sich aus vier, hier farblich abgesetzten Exons zusammen. Auf der Basis der 3. Fassung des *Drosophila*-Genomprojektes lokalisieren diese wie folgt: Exon1: 6.855.470 - 6.855.650, Exon2: 6.857.941 - 6.858.064, Exon3: 6.872.649 - 6.872.776, Exon4: 6.874.614 - 6.876.581. Der ORF hat eine Länge von 2250bp und ist schwarz unterlegt. Ebenfalls schwarz markiert ist der EST RE28585.5. Desweiteren gezeigt ist die Lokalisation der Primer, die für die RT-PCR (CG12443RT5.2 und CG12443RT3.2), die Herstellung der dsRNA (RNAiCG12443for und RNAiCG12443rev) oder die Klonierung des pUAS-FGF8-like1-HA-Effektorkonstruktes (UASCG12443 und UASCG12443 HA) verwendet wurden.

10	20	30	40
MSNQLERLLFFIVVISGALCTVEDYVIMSQCAHNKAIHIA			40
AEGTVSVTDTSQIQNITIVGFPDYLNNEFKIALYAKETQR			80
YLCFNDNWRLVGMRELRTCYFNETIVHGYVFRSVDLQ			120
RRVGFTHRGKPVGPKKSVNDACYMFNKIEAEQFFRHHNN			160
GNSGNNNGSGNDNGNGSNSNRKPPRNNKNNRHKSNN			200
QNQKLQQQEHGHNNNNNVILNNSNTSLSSTNKKQLAI			240
NRQRQQQQHQVRHHNDPSLLRRQHEKKQRRKQQKQ			280
QQHQQRVSASPTNPMPATPTAAPAATPTVAATSPATATRS			320
TTAAMSSKRKRRRKAKVRPKAQQQQQLLLATAATSPYT			360
DDTLYGSSSSSSTGFEDLDIYNSSSSSGSSSLDPWSTW			400
STIDFSFGSSTTATSDDSISSSSSNYDAWATYITEMEAE			440
ASAMTPEMGGNDTELMQYEAEVLDDPEAESTATIETKATS			480
VTSTIAATAATTTSTAGSQLVIEQTPLARSNISNKSSSST			520
KATPTATSQTETAQSTQQPSRHRNSREDHLDNSDMLLAG			560
ENEVKPQQPRKLLWTVQPPLATRGLATLVATPEQQHTS			600
TTATAATPEQHVAPSLFSDKNINSNLNNTL TEASPTAT			640
STSSITSATTMKRPIRKFTKLMATPYHQLTYVRNAGGDI			680
DIDNLDNISVYPVLYDGDLEGNGGGNSSDGGFSGFLPTST			720
TSHLTEPIRIGMNRIRPNKTLHWFTHQRFA.			751

Anhang2: Die Aminosäuresequenz von FGF8-like1

FGF8-like1 hat eine Länge von 750aa, davon entfallen 21aa auf das rot unterlegte, N-terminale Signalpeptid und 106aa auf die blau markierte FGF-Kerndomäne.



Anhang3: Die cDNA von *FGF8-like2*
 Legende auf der nächsten Seite.

Abkürzungen:

α -...	anti-...
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ähnl.	ähnlich
amp	Ampicillin
Anz.	Anzahl
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Bal.	Balancer-Chromosom
Bez.	Bezeichnung
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
CIP	alkalische Phosphatase (Kalb)
Chr.	Chromosom
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
E_{xxx}	Extinktion bei xxx nm Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
genom.	genomisch
h	Stunden
HRP	Meerrettich-Peroxidase
<i>hsp</i>	heat-shock promoter
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
konz.	konzentriert
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
Lsg.	Lösung
m...	milli...(10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
MCS	multi-cloning-site (Polylinker)
min	Minuten
...	mikro...(10 ⁻⁶)
mRNA	messenger-RNA
n...	nano...(10 ⁻⁹)
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
ORF	offenes Leseraster
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
pBsc	Bluescript-Plasmid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pot.	potentiell
Prom.	Promotor
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
St.-Lsg	Stamm-Lösung
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethyldiamin
Temp.	Temperatur
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
verm.	vermutlich
Vol.	Volumen
wdh.	wiederholen
ZNS	Zentralnervensystem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Zt.	zur Zeit

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn PD Dr. H.-Arno J. Müller angefertigt. Für die Betreuung, die guten Ratschläge, die Unterstützung bei eigenen Ideen und die angeregten Diskussionen gilt Ihm mein besonderer Dank.

Ebenfalls recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herzlich bedanken möchte ich mich speziell bei Alex, Andreas, Anna, Marion, Nora, Sabine, Soya und Walter für die Unterstützung und die schöne Zeit im A-Team Lab.

Andre Bachmann danke ich für seine Unterstützung, die mir auf die eine oder andere Art das Leben bereichert hat.

Desweiteren danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei: Sandra Berger, Olaf Bossinger, Astrid Dahl, Ferdi Grawe, Kevin Johnson, Jörg Liebmann, Meike Löbbecke, Monika Meyer, Christoph Segbert, Sylvia Tannebaum, Thorsten Volkmann, Isabel Wasserscheidt und Andreas Wodarz.

Einen besonderen Dank möchte ich außerdem Christoph Hennig aussprechen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit -einschließlich Tabellen und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von der unten angegebenen Publikation noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust und Herrn PD Dr. H.-Arno J. Müller betreut worden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Gryzik, T. und Müller, H.A. (2004). FGF8-like1 and FGF8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor Htl and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Curr Biol* 14, 659-67.