

**Charakterisierung der Funktion des Zink-Finger-  
Transkriptionsfaktors *klumpfuss* während der  
Entwicklung des peripheren Nervensystems bei  
*Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Markus Kaspar**

aus Troisdorf

Köln 2005

Berichtersteller:

Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein

Prof. Dr. Maria Leptin

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Februar 2005

**Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,  
dass die Dinge so sind wie sie sind**

*Aristoteles*  
*(384-322 v. Chr.)*

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten von <i>Drosophila</i> .....	1
1.2 Der <i>achaete-scute</i> -Komplex und die proneuralen Gene .....	4
1.3 Die Regulation der Expression von <i>ac</i> und <i>sc</i> .....	8
1.4 Der Notch-Signalweg und das Modell der lateralen Inhibition .....	13
1.5 Klumpfuss .....	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>2. ERGEBNISSE</b> .....	<b>19</b>
2.1 Die Überexpressionsanalyse von Klumpfuss .....	19
2.1.1 Die Überexpression von <i>klu</i> führt zu mehr mechanosensorischen Borsten .....	19
2.1.2 Die Überexpression von <i>klu</i> beeinflusst die SOP-Bildung .....	21
2.2 Die Funktions-Strukturanalyse von Klumpfuss .....	24
2.2.1 Die Bedeutung des N-Terminus .....	27
2.2.2 Die Bedeutung des C-Terminus und der Zink-Finger .....	36
2.2.3 Analyse der Klu-Funktion mit Hilfe von Fusionsproteinen.....	40
2.3 Analyse der funktionellen Beziehung von <i>klu</i> und den proneuralen Genen .....	46
2.3.1 Überexpression von <i>klu</i> in <i>ac/sc</i> -Doppelmutanten ( <i>Df(1)sc<sup>10.1</sup></i> ) .....	47
2.3.2 Überexpression von <i>klu</i> in <i>da</i> -mutanten Klonen .....	49
2.3.3 Die Überexpression von <i>klu</i> fördert die proneurale Aktivität .....	51
2.3.4 Auswirkung der <i>klu</i> -Überexpression auf die Expression der proneuralen Gene <i>ac</i> und <i>sc</i> .....	52
2.3.5 Die Überexpression von <i>klu</i> führt zur Aktivierung des SOP-Enhancers .....	59
2.4 Untersuchung der funktionellen Beziehung zwischen Klu und dem Notch-Signalweg.....	61
2.5 Untersuchung der funktionellen Beziehung zwischen Klu und <i>Emc</i> .....	65
<b>3. DISKUSSION</b> .....	<b>69</b>
3.1 Klu ist an der Determination der SOPs beteiligt .....	69
3.2 Strukturanalyse von Klu .....	71
3.3 Teile des N-Terminus sind essentiell für die Funktion von Klu .....	73
3.4 Der N-Terminus wird für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt .....	74
3.5 Die Analyse der Zink-Finger-Region .....	75
3.6 Klu fördert als Repressor die Determination der SOPs .....	77
3.7 Die Überexpression von <i>klu</i> hat weder einen Einfluss auf die Notch-Aktivität noch auf die Expression der Zielgene des Notch-Signalwegs.....	78
3.8 <i>klu</i> ist kein proneurales Gen und stark aber nicht absolut von der Aktivität der proneuralen Gene abhängig .....	80
3.9 Die Überexpression von <i>klu</i> erhöht die proneurale Aktivität .....	82

3.10 Klu supprimiert die Expression von <i>emc</i> .....	84
3.11 Ein Modell für die Klu-Funktion .....	86
3.12 Weiterführende Arbeiten.....	88
<b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>90</b>
4.1 Material .....	90
4.1.1 Chemikalien, Enzyme und Reaktionssets.....	90
4.1.2 Geräte und Arbeitsmaterialien.....	90
4.2 Oligonukleotide .....	91
4.3 Antikörper: .....	92
4.3.1 Primäre Antikörper.....	92
4.3.2 Sekundäre Antikörper.....	93
4.4 Bakterien .....	93
4.5 DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide.....	93
4.5.1 In dieser Arbeit hergestellte DNA-Konstrukte .....	93
4.6 Molekularbiologische Methoden.....	96
4.6.1 Lösungen, Puffer, Medien .....	96
4.6.2 Alkalische Lyse (Miniprep) von Plasmid-DNA.....	97
4.6.3 Alkalische Lyse (Midiprep) von Plasmid-DNA.....	97
4.6.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	97
4.6.5 Behandlung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonucleasen .....	98
4.6.6 Dephosphorylierung von freien DNA-Enden .....	98
4.6.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	98
4.6.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	99
4.6.9 Ligation .....	99
4.6.10 Präparation von elektrokompetenten Zellen .....	99
4.6.11 Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen.....	99
4.6.12 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen .....	100
4.6.13 Sequenzanalyse von DNA .....	100
4.7 <i>Drosophila</i> Methoden.....	100
4.7.1 Lösungen, Puffer, Medien .....	100
4.7.2 Fliegenstämme.....	101
4.7.3 Fliegenhaltung .....	103
4.7.4 Dechorionierung von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	104
4.7.5 Formaldehyd-Fixierung von <i>Drosophila</i> Embryonen.....	104
4.7.6 Methanol-Fixierung von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	104
4.7.7 Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	104
4.7.8 Herstellung transgener Fliegen mittels DNA-Injektion .....	105
4.7.9 DNA-Injektion in Embryonen .....	105
4.7.10 Präparation und Antikörperfärbung von Imaginalscheiben .....	105
4.7.11 Kutikula Präparation von adultem Gewebe.....	106
4.7.12 Das UAS/Gal4-Expressionssystem.....	106
4.7.13 UAS/Gal4 abhängige Expression in Klonen mittels FLP/FTR vermittelter mitotischer Rekombination .....	106
4.7.14 Das MARCM-System .....	107
<b>5. LITERATUR.....</b>	<b>108</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>117</b>

<b>7. ABSTRACT.....</b>	<b>118</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>119</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>10. ERKLÄRUNG .....</b>	<b>122</b>
<b>11. LEBENSLAUF .....</b>	<b>123</b>

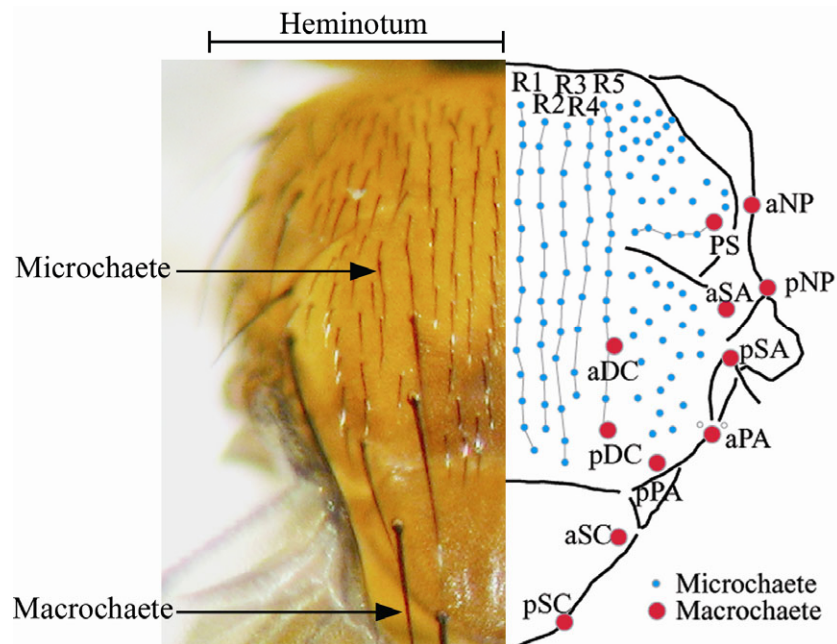
# 1. Einleitung

Die Entwicklung multizellulärer Lebewesen beginnt mit einer einzigen Zelle (der Eizelle), aus der ein komplexer Organismus entsteht, der sich aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt. Von besonderer Bedeutung bei dieser Entwicklung ist die Fähigkeit der Zellen, ihr Verhalten räumlich und zeitlich zu koordinieren und sich in reproduzierbaren, komplex strukturierten Mustern anzuordnen. Diese Art der biologischen Musterbildung wird durch interzelluläre Signalwege gesteuert, die eine unterschiedliche Differenzierung zunächst gleichartiger Zellen bewirken. Durch welche Mechanismen die Verteilung unterschiedlicher Zelltypen erfolgt und durch welche genetischen Interaktionen diese reguliert wird, ist eine der Hauptfragestellungen der Entwicklungsbiologie.

Viele Fragen der Musterbildung konnten in den letzten Jahrzehnten mit Hilfe so genannter Modellorganismen geklärt werden. Hierzu zählt auch die Taufliege *Drosophila melanogaster*, die sich nicht nur wegen ihrer kurzen Generationszeit und der hohen Anzahl an Nachkommen, sondern insbesondere durch die sehr gut etablierten genetischen und biochemischen Methoden zur Untersuchung grundlegender Fragestellungen der Entwicklungsbiologie eignet. Zahlreiche Studien zur Musterbildung wurden im peripheren Nervensystem (PNS) von *Drosophila* durchgeführt, da es zahlreiche Sinnesorgane in streng stereotypischen Positionen ausbildet. Den Hauptbestandteil des PNS der adulten Fliege bilden die in konstanten Mustern angelegten mechanosensorischen Borsten. Die neueren Verfahren der Gentechnologie erlauben es die Mechanismen, die zur Ausbildung des Borstenmusters führen, gezielt zu untersuchen und damit so komplexe Prozesse wie die frühe Entwicklung des peripheren Nervensystems (PNS) bei *Drosophila* systematisch zu analysieren.

## 1.1 Die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten von *Drosophila*

Die mechanosensorischen Borsten sind einfach aufgebaute Mechanorezeptoren, die sich auf der gesamten Körperoberfläche der Fliegen befinden und auf direkte mechanische Stimuli reagieren. Man unterscheidet zwei Typen von Borsten, die sich vor allem durch ihre Größe und Anzahl unterscheiden - sogenannte Macrochaeten und Microchaeten. Die Macrochaeten sind die größeren der beiden Borstentypen. Es werden genau 11 dieser Borsten pro Heminotum in einem sehr konstanten, stereotypen Muster angelegt, d.h. sie befinden sich immer an exakt der gleichen Position. Jeder dieser Borsten wurde entsprechend ihrer Position ein Name zugeordnet (Abb.1). Die zweite Gruppe der sensorischen Borsten sind die Microchaeten, die wesentlich kleiner sind. Auch sie werden zum Teil in einem regelmäßigen Muster angelegt. Pro Heminotum bilden sich im Bereich



**Abb.1: Die mechanosensorischen Borsten von *Drosophila melanogaster***

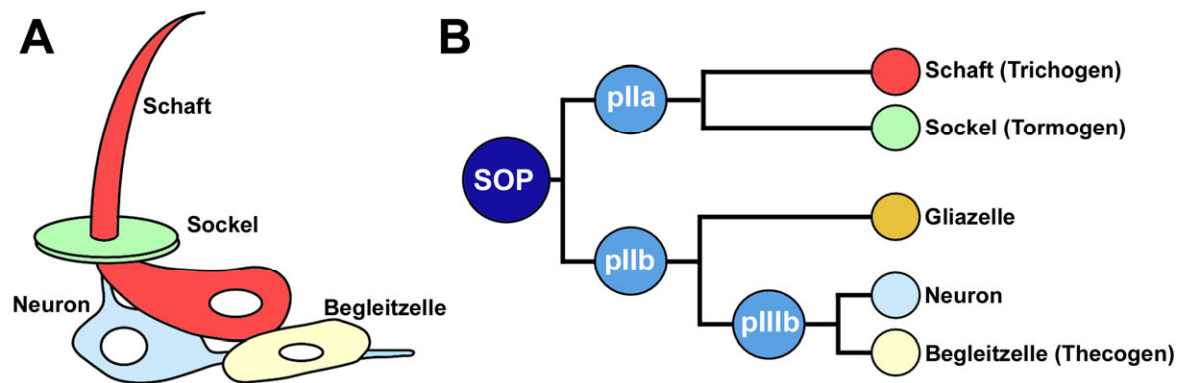
Auf dem Thorax von *Drosophila* finden sich zwei Arten von mechanosensorischen Borsten, die sich vor allem in ihrer Größe und Anzahl unterscheiden. Die größeren, die Macrochaeten, sind in einem streng stereotypen Muster angelegt, wobei pro Heminotum elf dieser Borsten gebildet werden. Jede Borste besitzt entsprechend ihrer Position einen spezifischen Namen (aNP: anterior notopleural; pNP posterior notopleural; PS: presuteral; aSA anterior supra-alar; pSA posterior supra-alar; aPA: anterior post-alar; pPA: posterior post-alar; aDC: anterior dorsozentral; pDC: posterior dorsozentral; aSC: anterior scutellar; pSC: posterior scutellar).

Die kleineren Microchaeten sind in einem weniger strengen Muster organisiert, sowohl Anzahl als auch Position können variieren. Im Bereich der acrostichalen Region werden sie in fünf longitudinalen Reihen angelegt (R1-R5), allerdings ist auch hier die Anzahl pro Reihe variabel. Der rechte Teil der Abbildung wurde entnommen aus Simpson et al., (1999) und modifiziert.

der acrostichalen Region fünf longitudinale Reihen von Microchaeten. Allerdings können bei diesem Borstentyp sowohl die Anzahl als auch die exakte Position variieren (Abb. 1) (Jan und Jan, 1994; Simpson et al., 1999; Usui und Kimura, 1993).

Beide Borstentypen bestehen aus vier Zellen. Die äußeren kutikularen Strukturen werden von der Schaft- (trichogene) und der Sockel- (tormogene) Zelle gebildet. Die subepidermalen Strukturen umfassen das Neuron, das die Borste an ihrer Basis innerviert und die Begleitzelle (thecogene Zelle), die das Neuron umgibt (Abb. 2 A). Eine fünfte Zelle, die Gliazelle, wandert unmittelbar nach ihrer Bildung weg und ist nicht am Aufbau der Borstenstruktur beteiligt. Alle fünf Zellen entstehen durch drei asymmetrische Zellteilungen aus einer einzelnen neuronalen Vorläuferzelle, der so genannten sensorischen Mutterzelle (sensory organ precursor = SOP). Die erste Teilung der SOP (pl) erfolgt in der Ebene des Epitheliums. Es bildet sich eine äußere Tochterzelle (plIa) aus der durch weitere Teilung Schaft und Sockelzelle hervorgehen, sowie eine innere Tochterzelle (plIb), die sich zunächst in Gliazelle und plIIb-Zelle teilt. Durch eine weitere Teilung der plIIb-Zelle werden das Neuron und die Begleitzelle gebildet (Gho et al., 1999; Hartenstein und Posakony, 1989) (Abb. 2 B).





**Abb. 2: Grundstruktur und Zellstammbaum der mechanosensorischen Borste**

(A) Schematischer Aufbau einer mechanosensorischen Borste. Die Borste besteht aus vier Zellen, zwei äußere bilden Schaft und Sockel, zwei innere das Neuron und die Begleitzelle. (B) Alle Zellen, die am Aufbau einer mechanosensorischen Borste beteiligt sind, gehen aus einer einzelnen Vorläuferzelle der sensorischen Mutterzelle (SOP) hervor. Durch drei asymmetrische Zellteilungen werden fünf Zelltypen gebildet, von denen vier direkt am Aufbau der Borste beteiligt sind. Die fünfte Zelle, die Gliazelle, wandert unmittelbar nach ihrer Entstehung weg und wird durch Apoptose aus dem Gewebe entfernt.

Die Entwicklung der sensorischen Borsten erfolgt in den Imaginalscheiben, den Anlagen der adulten Epidermis. Sie beginnt während des dritten larvalen Stadiums mit der Expression der proneuralen Gene *achaete* (*ac*) und *scute* (*sc*). Die Expression beider Gene ist räumlich und zeitlich exakt reguliert (s. Abschnitt 1.3.) und erfolgt nur in ganz bestimmten Gruppen von Zellen, den so genannten proneuralen Clustern (s. Abb. 3 A) (Cubas et al., 1991; Martinez und Modolell, 1991; Romani et al., 1989; Skeath und Carroll, 1991). Durch die Aktivität der beiden proneuralen Gene *ac* und *sc* erlangen zunächst alle Zellen eines proneuralen Clusters das Potential zur neuronalen Differenzierung. Die Zellen bilden somit eine Gruppe äquipotenter, neurogen kompetenter Zellen. Durch einen Selektionsprozess innerhalb des proneuralen Clusters, an dem u.a. die neurogenen Gene des Notch-Signalweges beteiligt sind und der als „laterale Inhibition“ bezeichnet wird, schlagen in jedem Cluster nur eine bzw. wenige Zellen den neurogenen Entwicklungsweg ein (s. Abschnitt 1.4). Diese Zelle(n), die sich stets an der gleichen, charakteristischen Position innerhalb eines Clusters befindet, differenziert sich zur Vorläuferzelle eines sensorischen Organs, der SOP. Alle anderen Zellen des Clusters schalten die Expression von *ac* und *sc* aus und werden zu epidermalen Vorläuferzellen (Epidermoblasten) (zur Übersicht siehe Modolell und Campuzano, 1998). Ein spezifisches Merkmal der sich differenzierenden SOP ist die Akkumulation großer Mengen von Ac- und Sc-Protein, wodurch sich diese Zelle klar von den anderen Zellen des proneuralen Clusters unterscheidet. Die Anreicherung der proneuralen Proteine gilt als eines der frühesten Erkennungszeichen für das SOP-Schicksal (Cubas et al., 1991; Skeath und Carroll, 1991) und ist essentiell für die Entwicklung eines sensorischen Organs (Culi und Modolell, 1998). Im Verlauf ihrer weiteren Differenzierung schaltet die SOP die Expression der

proneuralen Gene aus und durchläuft anschließend die drei bereits beschriebenen asymmetrischen Zellteilungen.

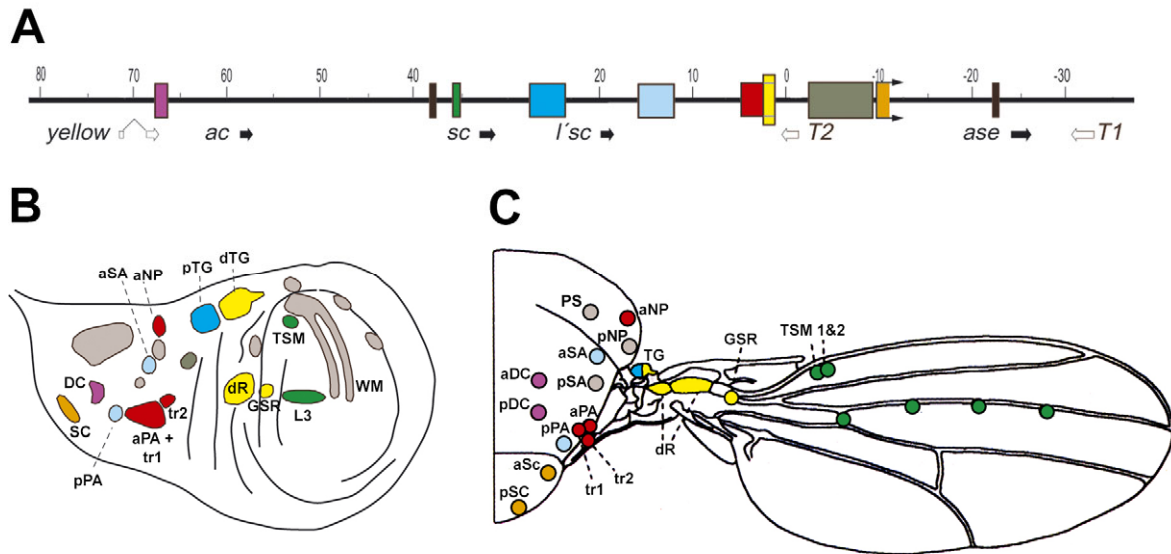
## 1.2 Der *achaete-scute*-Komplex und die proneuralen Gene

Durch die Aktivität der Gene des *achaete-scute*-Komplexes (AS-K) wird bestimmten Zellgruppen die Kompetenz zur neuronalen Differenzierung verliehen, d.h. die Zellen erlangen die intrinsische Fähigkeit, sich zu Vorläufern des Nervensystems zu entwickeln. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Zellen neuronale Kompetenz zu verleihen, werden diese Gene auch als proneurale Gene bezeichnet (Romani et al., 1989; zur Übersicht siehe: Bertrand et al., 2002; Campuzano und Modolell, 1992; Modolell und Campuzano, 1998).

Der AS-K ist an der Spitze des X-Chromosoms lokalisiert, erstreckt sich über eine genomische Region von fast 90 kb und umfasst vier Komplementationsgruppen: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l'sc*) und *asense* (*ase*) (Abb. 3A) (Alonso und Cabrera, 1988; Gonzalez et al., 1989). Alle vier Transkriptionseinheiten kodieren für ähnliche Proteine mit einer basischen Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH), ein konserviertes Motiv, das bei vielen Transkriptionsfaktoren, u.a. bei MyoD und myc der Vertebraten, zu finden ist (Garrell und Campuzano, 1991; Murre et al., 1989). Die proneuralen Gene des AS-K sind im Tierreich hoch konserviert und Homologe (Achaete-Scute-Homologe = ASH) finden sich in vielen Spezies von Hydra bis zu den Säugetieren (Allende und Weinberg, 1994; Grens et al., 1995; Lee, 1997).

Eine Voraussetzung für die Aktivität der proneuralen Gene während der Neurogenese ist die Interaktion mit *daughterless* (*da*). *da* kodiert ebenfalls für ein Protein mit bHLH-Motiv und ist in der Lage, Heterodimere mit den proneuralen Proteinen auszubilden. Durch verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die proneuralen Gene im Komplex mit Da an die DNA binden und Gene für den neuronalen Differenzierungsweg aktivieren (Cabrera und Alonso, 1991; Van Doren et al., 1991). Ein Ausfall der zygotischen Expression von *da* führt zum vollständigen Verlust des embryonalen PNS und damit zur embryonalen Letalität (Caudy et al., 1988). Da besitzt somit als aktivierender Co-Faktor der proneuralen Proteine eine essentielle Funktion für die Neurogenese und insbesondere für die Entwicklung des PNS. Die Bindung der Ac/Sc-Da-Heterodimere an die DNA wird durch die basische Region der bHLH-Domäne vermittelt, die sich in die große Furche der Doppelhelix legt. Als spezifische Erkennungssequenz dient eine Abfolge von sechs Nucleotiden die als E-Box bezeichnet wird. Die Konsensussequenz dieses Hexanucleotids lautet: **CAG(G/C)TG** (Martinez et al., 1993).

Für die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten des PNS sind nur zwei der vier Gene des AS-K - *ac* und *sc* - essentiell (Jan und Jan, 1994; Modolell, 1997; Romani et al.,



**Abb.3: Der *achaete-scute*-Komplex von *Drosophila***

Illustration der genomischen Region des *achaete-scute*-Komplexes (AS-K) zusammen mit einer Darstellung des Expressionsmusters von *ac* und *sc* in den proneural Clustern der Flügelimaginalscheibe und der Position der Borsten, die aus den einzelnen Clustern hervorgehen. (A) Molekulare Karte der genomischen Region des AS-K. Eingezeichnet sind die vier Transkriptionseinheiten (*ac*, *sc*, *l'sc*, *ase*) sowie die verschiedenen Enhancerelemente, die die Expression von *ac* und *sc* in der Flügelimaginalscheibe steuern. (B) Schematische Darstellung einer Flügelimaginalscheibe mit den verschiedenen proneuralen Clustern in denen *ac* und *sc* exprimiert werden. Die Expression beider Gene in dem jeweiligen Cluster, wird durch den in (A) farblich entsprechenden Enhancer gesteuert. (C) Schematische Darstellung der adulten Strukturen, die aus der Flügelimaginalscheibe hervorgehen (Hemiothorax + Flügel). Eingezeichnet sind die Positionen der Macrochaeten, die in dem farblich entsprechenden proneuralen Cluster (B) gebildet werden (Abkürzungen s. Abb. 1).

Die Abbildung wurde aus Gómez-Skarmeta et al., (1995) entnommen und modifiziert.

1989). Der Ausfall beider Genfunktionen führt zum fast vollständigen Verlust aller externen sensorischen Sinnesorgane insbesondere im Bereich des Thorax und des Kopfes (Campuzano et al., 1985; García-Bellido, 1979). Im Gegensatz dazu resultiert die Überexpression von *ac* und *sc* in der Ausbildung ektopischer Borsten (Rodriguez et al., 1990). Anhand verschiedener Ausfallmutationen konnte gezeigt werden, dass die Funktion beider Gene zumindest teilweise redundant ist.

Die Expression von *ac* und *sc* führt zur Aktivierung einer Reihe von Zielgenen. Eines dieser Zielgene ist *scabrous* (*sca*), ein sekretiertes Protein, das in nicht zellautonomer Art und Weise an der Regulation der Abstände zwischen einzelnen sensorischen Borsten und damit an der Ausbildung des allgemeinen Borstenmusters beteiligt ist (Hu et al., 1995; Mlodzik et al., 1990; Renaud und Simpson, 2001). Aufgrund der Abhängigkeit von *ac* und *sc* wird *sca* in gleicher Weise wie die beiden proneuralen Gene exprimiert und kann daher für den Nachweis proneuraler Aktivität herangezogen werden.

Eine weitere wichtige Gruppe von *Ac/Sc*-Zielgenen sind die so genannten „neural precursor“ – oder panneuralen Gene, die verschiedene Aspekte der neuronalen Differen-

zierung einleiten. Zu dieser Klasse zählt auch das Gen *ase*, das an der Differenzierung der meisten SOPs beteiligt ist. Es wird demnach auch nicht im gesamten proneuralen Cluster, sondern nur in der SOP und in deren Tochterzellen exprimiert. *ase* besitzt zusätzlich auch proneurale Aktivität, da es die Determination einer kleinen Gruppe von SOPs steuert, aus denen eine Reihe von Borsten („recurved“ Borsten) am anterioren Flügelrand hervorgeht (Brand et al., 1993; Dominguez und Campuzano, 1993; Jarman et al., 1993a).

Im Gegensatz zu *ac*, *sc* und *ase* besitzt das vierte Gen des AS-Ks, *l'sc*, normalerweise keine Funktion für die Bildung der mechanosensorischen Borsten. Dennoch führt die ekto- pische Expression jedes einzelnen der proneuralen Gene zur Ausbildung ekto- pischer Sinnesborsten. Dies verdeutlicht, dass alle vier Transkripte des AS-K proneurale Aktivität besitzen und dass sie trotz ihrer zum Teil unterschiedlichen Funktionen zumindest partiell redundant sind (Brand et al., 1993; Dominguez und Campuzano, 1993; Hinz et al., 1994; Rodriguez et al., 1990).

Neben den vier Transkripten des AS-K gibt es noch weitere Faktoren mit einer bHLH- Domäne, die zu der Klasse der proneuralen Gene gezählt werden. Hierzu gehören die beiden Gene *atonal* (*ato*) und *amos* (*absent md neurons and olfactory sensilla*) (Goulding et al., 2000; Huang et al., 2000; Jarman et al., 1993b). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit ihrer bHLH-Domänen (74% Identität), die sich allerdings deutlich von denen der proneuralen Gene des AS-K unterscheidet, bilden *ato* und *amos* eine eigene Unterklasse der proneuralen Gene. Beide Faktoren formen ebenfalls Heterodimere mit Da, deren Aktivität für die Entwicklung verschiedener Organe des peripheren Nervensystems von *Drosophila* benötigt wird (Goulding et al., 2000; Jarman et al., 1993b). So ist proneurale Aktivität von *ato* essentiell für die Determination der R8-Photorezeptorzelle, die Anlage der Chordotonalorgane (interne Propriozeptoren) und die Ausbildung einiger multidendritischer Neuronen (Jarman et al., 1994; Jarman et al., 1995). Nullmutationen von *ato* führen zu einem Verlust der entsprechenden Sinnesorgane und zu stark verkleinerten Augen ohne Photorezeptoren (Jarman et al., 1994; Jarman et al., 1995). *ato* besitzt auch eine Funktion bei der Entwicklung des olfaktorischen Systems der Fliege, das auf dem dritten antennalen Segment lokalisiert ist. Hier wird es für die Determination einer der drei Arten von Geruchsrezeptoren – der Sensilla Coeloconica – benötigt (Gupta und Rodrigues, 1997). Die Entwicklung der beiden anderen Sensillenarten, Sensilla Basiconica und Sensilla Trichioidea, beruht dagegen auf der Aktivität von *amos* (Goulding et al., 2000). Des Weiteren wird *amos* für die Ausbildung zweier Arten von md-Neuronen gebraucht (Huang et al., 2000). Ein Ausfall von *amos* resultiert in dem Verlust dieser Neuronen sowie aller Geruchssensillen des Typs Basiconica und Trichioidea (zur Lage et al., 2003). Außerdem kommt es zur Ausbildung ekto- pischer, mechanosensorischer

Borsten am dritten antennalen Segment. In dieser Region werden normalerweise keine Borsten gebildet. Der *amos*-mutante Phänotyp stellt eine Besonderheit dar, da der Ausfall der proneuralen Funktion nicht zum ersatzlosen Verlust des Sinnesorgans führt (wie bei den proneuralen Genen des *AS-K* und *ato*), sondern eine Transformation von einem Typ Sinnesorgan (Geruchssensillen) in einen anderen Typ (mechanosensorische Borsten) erfolgt. Der Ausfall von *amos* ist mit einer Hochregulation der *sc* Aktivität in den entsprechenden Vorläuferzellen verknüpft. Es wird daher vermutet, dass es eine Aufgabe von *amos* ist, die Aktivität von *sc* in den entsprechenden SOPs des dritten antennalen Segments zu unterdrücken und dadurch das Entwicklungsschicksal in Richtung Geruchssinnesorgan aufrechtzuerhalten (zur Lage et al., 2003). Interessanterweise ist eine vergleichbare gegenseitige Inhibierung von proneuralen Faktoren auch bei der Neurogenese der Maus beobachtet worden (Gowan et al., 2001).

Eine gezielte Überexpression von *ato* oder von *amos* in den proneuralen Clustern der Flügelimaginalscheibe führt zur Ausbildung ektopischer Chordotonalorgane an Positionen, an denen normalerweise mechanosensorische Borsten entstehen (Goulding et al., 2000; Jarman und Ahmed, 1998). Es kommt also auch in dieser Situation zu einer Änderung des Entwicklungsschicksals der SOP. Dieses Ergebnis zeigt, dass die proneuralen Gene nicht nur für die Determination der SOP benötigt werden, sondern auch das weitere Entwicklungsschicksal dieser Zellen beeinflussen. Eine Möglichkeit, Einfluss auf die weitere Entwicklung der SOP zu nehmen, besteht in der differentiellen Aktivierung von Zielgenen. Zu diesen Zielgenen, die die Identität sich entwickelnder Sinnesorgane regulieren, gehört *cut*. Es kodiert für ein Protein mit einer Homöodomäne und wird in allen *ac/sc*-abhängigen SOPs exprimiert (Blochlinger et al., 1990; Jarman und Ahmed, 1998). Ein Ausfall der *cut*-Expression in diesen SOPs ändert das Entwicklungsschicksal der Zellen und es bilden sich anstelle mechanosensorischer Borsten Chordotonalorgane (Bodmer et al., 1987). In gleicher Weise führt eine künstliche Expression von *cut* in den SOPs der Chordotonalorgane zu einer Änderung des Differenzierungsschicksals und zur Ausbildung externer, sensorischer Borsten (Blochlinger et al., 1991). Da *cut* für die weitere Differenzierung der SOP essentiell ist, muss dieses Gen entsprechend präzise reguliert werden. Es wird vermutet, dass in den SOPs der Borsten die Expression von *cut* direkt von *Ac/Sc* aktiviert wird, während in den SOPs der Chordotonalorgane *ato* die *cut* Expression aktiv reprimiert. Durch die Unterdrückung von *cut* wird die Expression derjenigen Gene ermöglicht, die die Differenzierung der SOP zu einem Chordotonalorgan steuern (Jarman und Ahmed, 1998).

Allerdings scheint die Festlegung des Entwicklungsschicksals der SOP nicht alleine durch die Aktivität der proneuralen Gene gesteuert zu werden, sondern auch von dem Gewebe abhängig zu sein, in dem diese Gene exprimiert werden. So kann die ektopische Expres-

sion von *amos* sowohl zur Entstehung ektopischer Chordotonalorgane, zur Bildung ektopischer Geruchssensillen oder auch zur Bildung mechanosensorischer Borsten führen, in Abhängigkeit von dem Gewebetyp, in dem die Expression erfolgt (Goulding et al., 2000; Lai, 2003; Villa-Cuesta et al., 2003). Zusammenfassend kann man daher feststellen, dass die Festlegung des Weiteren Differenzierungsschicksals einer SOP sowohl von der Art des proneuralen Gens bestimmt wird, als auch von dem Gewebe abhängig ist, in dem die Expression des proneuralen Gens erfolgt.

### 1.3 Die Regulation der Expression von *ac* und *sc*

Die kodierende Region des *achaete-scute*-Komplexes umfasst nur einen sehr kleinen Teil des gesamten Gen-Komplexes. In dem nicht kodierenden Bereich befinden sich zahlreiche cis-regulatorische Sequenzen, die als Enhancer-Elemente die Expression der AS-K Gene in einem komplexen Muster räumlich und zeitlich regulieren. Diese Enhancer-Elemente sind sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von den jeweiligen Transkriptionseinheiten lokalisiert (Abb. 3 A) (Gomez-Skarmeta et al., 1995; zur Übersicht siehe: Modolell und Campuzano, 1998). Die Aktivität der verschiedenen Enhancer-Elemente führt dazu, dass *ac* und *sc* innerhalb der Flügelimaginalscheibe nur in den proneuralen Clustern exprimiert werden (Abb. 3 B) (Cubas et al., 1991; Martinez und Modolell, 1991; Romani et al., 1989; Skeath und Carroll, 1991). Größe, Position, Form sowie der Zeitpunkt ihrer Ausbildung wird durch die verschiedenen Enhancer-Elemente präzise reguliert und ist daher genau reproduzierbar. Ein einzelner Enhancer ist in der Regel für die Expression sowohl von *ac* als auch von *sc* innerhalb eines bzw. weniger proneuraler Cluster verantwortlich, unabhängig davon, ob sich der Enhancer stromaufwärts von *ac*, zwischen *ac* und *sc* oder stromabwärts von *sc* befindet (Gomez-Skarmeta et al., 1995).

Neben den Enhancer-Elementen, die die allgemeine Expression von *ac* und *sc* in den proneuralen Clustern regulieren, gibt es einen weiteren Enhancer, der die bereits beschriebene Akkumulation der proneuralen Gene in der SOP steuert (s. Abschnitt 1.1). Dieses als SOP-Enhancer bezeichnete cis-regulatorische Element konnte auf ein 356bp großes Fragment eingegrenzt werden, das sich unmittelbar 5' von der *sc* Transkriptionseinheit befindet (Culi und Modolell, 1998). Innerhalb dieser Sequenz finden sich zahlreiche, konservierte Motive, die die Aktivität des Enhancers regulieren, unter anderem drei E-Boxen (E1, E2, E3), von denen zwei (E1 und E2) essentiell sind und als Bindungsstellen für Ac/Sc-Da-Heterodimere dienen. Ac und Sc können somit direkt an den SOP-Enhancer binden und über einen positiven Rückkopplungsmechanismus ihre eigene Expression in der entstehenden SOP fördern (Culi und Modolell, 1998). Die starke

Aktivierung der proneuralen Gene in der SOP beruht aber nicht alleine auf der autoregulatorischen Aktivität von *ac* und *sc*, sondern benötigt noch einen weiteren Faktor: den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *senseless* (*sens*). Durch eine klonale Analyse konnte gezeigt werden, dass durch einen Ausfall von *sens* die Akkumulation von *Sc* in einzelnen Zellen verhindert wird. Dies hat zur Folge, dass die zunächst angelegten SOPs in der weiteren Entwicklung verloren gehen und die entsprechenden Borsten in den adulten Individuen fehlen (Nolo et al., 2000). *Sens* fördert die Expression der proneuralen Gene, während gleichzeitig seine eigene Expression direkt von *ac* und *sc* abhängig ist (Jafar-Nejad et al., 2003). Dadurch entsteht ein positiver Rückkopplungsmechanismus, der zu der hohen proneuralen Konzentration in der SOP beiträgt und die Aufrechterhaltung des SOP-Schicksals innerhalb des proneuralen Clusters sicherstellt.

Neben den E-Boxen enthält der SOP-Enhancer auch Bindungstellen, die dem Bindungsmotiv für Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie gleichen ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3), sowie eine potentielle Bindungsstelle für bHLH-Proteine des *Enhancer of split*-Komplexes (*E(spl)*-K) (N-Box) und drei T-reiche Motive, die keinem der bisher bekannten Proteinbindungsmotiven entsprechen ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3). Allerdings ist neben der E1-Box nur eine der NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen ( $\alpha$ 3) essentiell für die Aktivität des Enhancers. Dies konnte mit Hilfe eines künstlichen Minimalenhancers (OC10) gezeigt werden, der aus vier Wiederholungen von zwei E1-Boxen und einer  $\alpha$ 3-Box besteht. Dieser Minimalenhancer ist in der Lage, die Expression eines Reportergens ausschließlich innerhalb der SOP zu induzieren (Culi und Modolell, 1998). Er scheint somit alle für eine Expression in der SOP essentiellen Regulationselemente zu enthalten.

Im Gegensatz zu der autoregulatorischen Expression der proneuralen Gene in der SOP beruht ihre Expression in den proneuralen Clustern auf der kombinatorischen Aktivität verschiedener „prepattern-Gene“. Diese Gene werden in der Flügelimaginalscheibe in großen, sich überlagernden Domänen exprimiert, so dass die verschiedenen Enhancerelemente durch unterschiedliche Kombination von Prepattern-Faktoren in ihrer Aktivität reguliert werden (Gomez-Skarmeta et al., 2003; Modolell und Campuzano, 1998). Durch die partiell überlappende Verteilung der Prepattern-Gene erlangen die verschiedenen Enhancerelemente des AS-K die Positionsinformation, die für die räumlich und zeitlich komplexe Expression von *ac* und *sc* benötigt wird. Obwohl das Konzept des „Prepatterns“ bereits 1954 postuliert wurde (Stern, 1954), gelang der molekulare Nachweis der Prepattern-Gene erst in den letzten zehn Jahren. Zu der Gruppe der bekannten Prepattern-Gene werden unter anderem die Gene des *iroquois*-Komplexes (*IRO*-K) gezählt, der von den drei Genen *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) und *mirror* (*mirr*) gebildet wird. Alle drei Gene kodieren Proteine mit einer Homöodomäne. Sie werden in breiten Domänen innerhalb der Flügelimaginalscheibe exprimiert, die mit den Expressions-

domänen der meisten proneuralen Felder überlappt. Ein Ausfall der IRO-K Proteine führt zum Verlust der *ac/sc* Expression in bestimmten proneuralen Feldern und der entsprechenden sensorischen Organe (Cavodeassi et al., 2001; Gomez-Skarmeta et al., 1996; Gomez-Skarmeta und Modolell, 1996; Kehl et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ara *in vitro* direkt an einen der *as/sc* Enhancerelemente binden kann und dass diese Bindung für die Aktivität des Enhancers benötigt wird (Gomez-Skarmeta et al., 1996). Es wird daher angenommen, dass die Gene des *iroquois*-Komplexes als direkte Aktivatoren von *ac* und *sc* innerhalb der proneuralen Felder agieren.

Zwei weitere Prepattern-Faktoren sind der GATA1-Transkriptionsfaktor Pannier (Pnr) und sein Antagonist, das Zinkfinger-Protein U-shaped (Ush). Beide Faktoren regulieren zusammen die Expression von *ac* und *sc* u.a. im dorsozentralen Cluster. Exprimiert werden beide Faktoren in überlappenden Domänen im proximal dorsalen Teil der Flügelimaginalscheibe (Cubadda et al., 1997; Heitzler et al., 1996b). Pnr bindet direkt an den Enhancer, der die Expression von *ac* und *sc* im dorsalen Cluster reguliert (dorsozentraler Enhancer = DC-E) und aktiviert so die Expression der proneuralen Gene (Garcia-Garcia et al., 1999). Negativ reguliert wird die Aktivität von Pnr durch Ush, indem es mit Pnr ein Heterodimer bildet, wodurch Pnr seine Aktivatorfunktion verliert (Haenlin et al., 1997). Die Ausdehnung des dorsozentralen proneuralen Feldes in medial-lateraler Richtung wird demnach durch die konzentrationsabhängige Verfügbarkeit von freiem, nicht dimerisiertem Pnr bestimmt. Ein vollständiger Ausfall der *pnr*-Funktion führt zum Verlust der Expression von *ac* und *sc* im dorsozentralen proneuralen Feld und zum Verlust der entsprechenden Macrochaeten (Heitzler et al., 1996b). Ein Co-Faktor, der für die Aktivität von *pnr* benötigt wird, ist *Chip*, ein ubiquitär exprimiertes, nukleares Protein, das *in vitro* mit Pnr und mit Ac/Sc-Da-Heterodimeren physisch interagieren kann. Es wird daher angenommen, dass es eine Art Brückenfunktion einnimmt und eine direkte Interaktion zwischen dem Enhancer (mit dem daran gebundenen Pnr) und dem Promotor (mit dem daran gebundenen Ac/Sc-Da Heterodimer) der proneuralen Gene *ac* und *sc* ermöglicht (Heitzler et al., 2003; Romain et al., 2000).

Ein gut untersuchtes regulatorisches Protein, das die Expression insbesondere von *ac* direkt reguliert, ist der bHLH-Transkriptionsfaktor *Hairy* (Rushlow et al., 1989). Das Protein agiert als Repressor, indem es unmittelbar vor dem Transkriptionsstart von *ac* an die DNA bindet und die Expression des Gens unterdrückt (Ohsako et al., 1994; Van Doren et al., 1994). Exprimiert wird *hairy* während der pupalen Phase in den Anlagen des sich differenzierenden Notums und des Flügels und kontrolliert hier die Anzahl und Position der Microchaeten (Carroll und Whyte, 1989). Einen Einfluss auf die Ausbildung



der Macrochaeten ist nicht bekannt. Ob *hairy* die Expression von *sc* ebenfalls beeinflusst, ist unklar. Es wird vermutet, konnte aber bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Alle bisher beschriebenen Prepatter-Gene regulieren die proneurale Aktivität, indem sie direkt die Expression von *ac* und *sc* beeinflussen. Daneben gibt es aber auch Faktoren, die die Aktivität von *Ac* und *Sc* auf posttranslationaler Ebene durch direkte Protein-Protein-Interaktionen regulieren. Zu diesen Proteinen zählt das Genprodukt von *extra-macrochaete* (*emc*) (Botas et al., 1982). Ausfallmutationen von *emc* resultieren in der Ausbildung zusätzlicher Macrochaeten an ektopischen Positionen, während eine Erhöhung der Aktivität wie für das *emc*-Allel *Achaetous* (*Ach*) beschrieben, zum Verlust von Borsten an wildtypischen Positionen führt (García-Alonso und Garcia-Bellido, 1988; Moscoso del Prado und Garcia-Bellido, 1984a; Moscoso del Prado und Garcia-Bellido, 1984b). *emc* kodiert ein Protein mit einem HLH-Motiv ohne basische DNA-Bindungsdomäne, so dass es nicht an die DNA binden kann (Campuzano, 2001; Ellis et al., 1990; Garrell und Modolell, 1990). Das Protein besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu *Ac* und *Sc* und ist in der Lage, Heterodimere mit beiden proneuralen Proteinen auszubilden. Allerdings können diese Heterodimere nicht an die DNA-Zielsequenz der proneuralen Gene binden und sind demzufolge inaktiv. Durch die Ausbildung inaktiver Komplexe mit *Ac* und *Sc* bzw. *Da* verhindert *Emc*, dass sich funktionale *Ac/Sc-Da*-Heterodimere ausbilden können und wirkt somit als Antagonist proneuraler Aktivität (Cabrera et al., 1994; Van Doren et al., 1991). Exprimiert wird *emc* in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe. Es gibt jedoch deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke der verschiedenen Bereichen der Scheibe, mit Tälern der Expression im Bereich der proneuralen Felder und Bereichen hoher Expression außerhalb *Ac/Sc*-Expressionsdomänen (Cubas und Modolell, 1992; Van Doren et al., 1992). Innerhalb eines proneuralen Clusters bildet sich die SOP immer in der Position mit der geringsten *emc*-Expression. Es wird angenommen, dass innerhalb eines proneuralen Clusters die *Emc*-Konzentrationen einen Schwellenwert proneuraler Aktivität definieren, der überschritten werden muss, damit sich eine Zelle zur SOP differenzieren kann. Nur diejenigen Zellen, die innerhalb des Clusters genügend *Ac/Sc* exprimieren, um *Emc* weg zu titrieren und gleichzeitig die Gene für die neuronale Differenzierung zu aktivieren, haben überhaupt die Möglichkeit, sich zur SOP zu entwickeln (Campuzano, 2001; Cubas und Modolell, 1992). Die durch die Expression von *emc* bewirkte Eingrenzung der Zellen mit neurogener Kompetenz stellt eine Verfeinerung des von *ac* und *sc* vorgegebenen Musters dar. Die räumliche und zeitliche Verteilung des *Emc*-Proteins spielt somit eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Position, an der sich die SOP entwickelt und damit für die Musterbildung innerhalb des peripheren Nervensystems (s. Abschnitt 1.3).

Neben den hier beschriebenen Prepattern-Genen sind noch eine Anzahl weiterer Faktoren direkt oder indirekt an der Regulation der Expression von *ac* und *sc* innerhalb der proneuralen Felder beteiligt. Hierzu zählen unter anderem Signalmoleküle wie der TGF $\beta$ -Faktor Decapentaplegic (*Dpp*), Wingless (*Wg*) und EGF, deren Aktivität die Flügelimaginalscheibe in verschiedene Territorien unterteilt (Mullor et al., 1997; Phillips und Whittle, 1993; Sato et al., 1999; Tomoyasu et al., 1998).

Ein weiterer Faktor, der die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* außerhalb der Flügelimaginalscheibe differentiell reguliert, ist das homöotische Gen *Ultrabithorax* (*Ubx*). Durch die Aktivität von *Ubx* wird die Identität des dritten thorakalen Segments festgelegt. Insbesondere steuert es die Differenzierung der Haltere und verhindert, dass sich ein weiteres Flügelpaar ausbildet. Ein Verlust der *Ubx*-Aktivität führt zu einer Transformation der beiden Halteren in ein zweites Paar Flügel (Lewis, 1978). *Ubx*, das nur in der Halteren- nicht aber in der Flügelimaginalscheibe exprimiert wird (White und Wilcox, 1984), reguliert die Expression von *ac* und *sc* in verschiedenen Bereichen der Halterenscheibe auf unterschiedliche Art und Weise (Weatherbee et al., 1998). Entlang der dorsoventralen Grenze unterdrückt *Ubx* die Expression der beiden proneuralen Gene und verhindert dadurch die Bildung von mechanosensorischen Borsten auf den Halteren. Die Repression der proneuralen Gene durch *Ubx* ist allerdings dosisabhängig. So führt eine Herabsetzung der *Ubx*-Aktivität zu einer Derepression von *sc* im Bereich der d/v Grenze und hat die Ausbildung ektopischer mechanosensorischer Borsten zur Folge. In gleicher Weise resultiert eine Erhöhung der proneuralen Aktivität durch eine Überexpression von *sc* ebenfalls in der Bildung ektopischer Borsten. Im Gegensatz dazu wird in anderen Bereichen der Halterenscheibe die Aktivität von *Ubx* benötigt, um die Expression von *sc* aufrecht zu halten. Hierzu zählt die pedizellulare Region, in dem die Expression von *sc* für die Ausbildung der pedizellularen Sensillen benötigt wird, einem speziellen Typ Sinnesorgan, der nur auf der Haltere, nicht aber auf dem Flügel gebildet wird. Ein Ausfall der *Ubx*-Aktivität führt in diesem Bereich zum Verlust der *sc*-Expression und damit zum Verlust der pedizellularen Sensillen. *Ubx* hat demnach sowohl einen aktivierenden als auch reprimierenden Einfluss auf die Expression von *ac* und *sc*. Es wird vermutet, dass diese differentielle Regulation über die verschiedenen cis-regulatorischen Enhancer-Elemente des *AS-K* erfolgt. Allerdings ist nicht klar, ob *Ubx* direkt an diese Elemente binden kann und somit die Expression unmittelbar reguliert (Weatherbee et al., 1998).

## 1.4 Der Notch-Signalweg und das Modell der lateralen Inhibition

Wie bereits beschrieben, entsteht die SOP durch einen Selektionsprozess, der sicherstellt, dass nicht alle Zellen eines proneuralen Clusters den neurogenen Entwicklungsweg einschlagen (s. Abschnitt 1.1). Dieser Selektionsprozess beruht darauf, dass sobald eine Zelle neuronale Kompetenz erreicht hat, sie durch entsprechende inhibitorische Signale ihre Nachbarn daran hindert, das gleiche Entwicklungsschicksal anzunehmen. Eine zentrale Funktion bei diesem als laterale Inhibition bezeichneten Vorgang besitzt der Notch-Signalweg. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs resultiert in einer Verringerung der proneuralen Aktivität. Fällt die proneurale Aktivität unter den Schwellenwert der für die Entwicklung zur SOP benötigt wird, differenziert sich die betreffende Zelle zu einer epidermalen Vorläuferzelle (zur Übersicht s. Modolell und Campuzano, 1998).

Der Notch-Signalweg ist hochkonserviert und findet sich bei allen höheren Eumetazoen von den Nematoden bis hin zum Menschen. Er steuert eine Vielzahl von Differenzierungsprozessen, indem er durch direkte Zell-Zell-Interaktion das Differenzierungsschicksal benachbarter Zellen reguliert. Die wichtigsten Komponenten dieses Signalwegs sind der eigentliche Rezeptor, der durch das Gen *Notch* (*N*) kodiert wird und sein Ligand *Delta* (*DI*). Beide kodieren für große Transmembranproteine mit einer extrazellulären Domäne, die ein dem epidermalen Wachstumsfaktor von Säugern homologes repetitives Sequenzmotiv aufweist (EGF-repeat) (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai, 2004; Schweisguth, 2004). Durch die Bindung des Liganden DI an den Notch-Rezeptor wird der Notch-Signalweg aktiviert. Es erfolgen zwei proteolytische Spaltungen, in dessen Folge die intrazelluläre Domäne des Rezeptors freigesetzt wird (Brou et al., 2000; De Strooper, 2003; Kopan und Goate, 2000; Lai, 2002; Lieber et al., 2002). Nach der Abspaltung erfolgt eine Translokation der intrazellulären Domäne in den Zellkern. Dort interagiert sie u.a. mit dem Transkriptionsfaktor Suppressor of Hairless (*Su(H)*) und reguliert die Expression der Zielgene (Bray und Furriols, 2001; Klein et al., 2000; Morel und Schweisguth, 2000). In den Zellen des proneuralen Clusters führt die Aktivierung des Notch-Signalwegs zur Expression der Gene des *Enhancer-of-split*-Komplexes (*E(spl)*-K) (Bailey und Posakony, 1995; Lecourtois und Schweisguth, 1995). Diese Gene kodieren Proteine mit einer bHLH-Domäne, die als Repressoren, zusammen mit dem Co-Repressor *groucho* (*gro*), die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* unterdrücken. Sie sind zudem in der Lage, inaktive Heterodimere mit den proneuralen Faktoren auszubilden (Giagtzoglou et al., 2003; Heitzler et al., 1996a; Oellers et al., 1994; Paroush et al., 1994). Somit bewirkt die Aktivierung des Notch-Signalwegs eine Verringerung der proneuralen Aktivität in der Zelle. Da die Expression des Liganden DI ebenfalls von *ac* und *sc* abhängig ist, führt die Abnahme der proneuralen Aktivität gleichzeitig zur einer geringeren Expression von *DI* (Kunisch et al., 1994). Eine Reduktion von DI hat aber zur Folge, dass diese Zellen

benachbarte Zellen weniger stark hemmen können. Analog dazu bewirkt eine Erhöhung der proneuralen Aktivität in einer Zelle eine gesteigerte Expression von *DI*. Dadurch kann diese Zelle benachbarte Zellen verstärkt hemmen und wird in der Folge selbst weniger inhibiert. Das postulierte Modell der lateralen Inhibition geht genau von einem derartigen Rückkopplungsmechanismus aus. Zunächst bilden alle Zellen eines proneuralen Clusters eine Äquivalenzgruppe, in der sich die Zellen im gleichen Maße gegenseitig inhibieren („mutual“ Inhibition). Doch dann beginnt eine dieser Zellen, die zukünftige SOP, möglicherweise aufgrund von Fluktuationen in der Aktivität von regulatorischen Faktoren wie *sens* oder *emc* etwas mehr des Liganden *DI* zu exprimieren. Dadurch ist diese Zelle in der Lage, in benachbarten Zellen verstärkt den Notch-Signalweg zu aktivieren, was zur Folge hat, dass in diesen Zellen die proneurale Aktivität, und damit verbunden, die Expression von *DI*, abnimmt. Weniger Ligand bedeutet aber, dass diese Zellen die zukünftige SOP weniger hemmen können, wodurch in dieser Zelle die proneurale Aktivität und damit die Expression von *DI* weiter ansteigen kann. Durch diesen positiven Rückkopplungsmechanismus wird eine anfänglich sehr geringe Asymmetrie oder Fluktuation des Signals graduell stabilisiert. Dies führt letztendlich dazu, dass in der zukünftigen SOP die proneurale Aktivität über einen Schwellenwert ansteigt und diese Zelle den neurogenen Differenzierungsweg einschlägt. Gleichzeitig kann sie alle anderen Zellen sehr effizient inhibieren, die dadurch die Expression von *ac* und *sc* einstellen und ein epidermales Schicksal annehmen.

Das hier beschriebene Modell der lateralen Inhibition lässt jedoch noch einige Fragen zur Selektion der SOP unbeantwortet. So ist z.B. nicht klar, wie ein Inhibitionsmechanismus, der auf Zell-Zell-Kontakten beruht, in der Lage ist, Zellen zu inhibieren, die weiter als ein Zelldurchmesser entfernt sind, zu denen die zukünftige SOP also keinen direkten Zellkontakt besitzt. Ein Erklärungsansatz dafür beruht auf der Beobachtung, dass die zukünftige SOP verstärkt Zellfortsätze so genannte Filopodien ausbildet, die *DI* exprimieren. Die Ausbildung dieser Filopodien ist dabei selbst von der Expression von *DI* abhängig (De Jossineau et al., 2003). Da derartige Zellfortsätze mehrere Zelldurchmesser lang werden können, gehen die Autoren davon aus, dass auf den Filopodien lokalisiertes *DI* den Notch-Signalweg in weiter entfernten Zellen aktivieren kann und damit zur Selektion der SOP beiträgt.

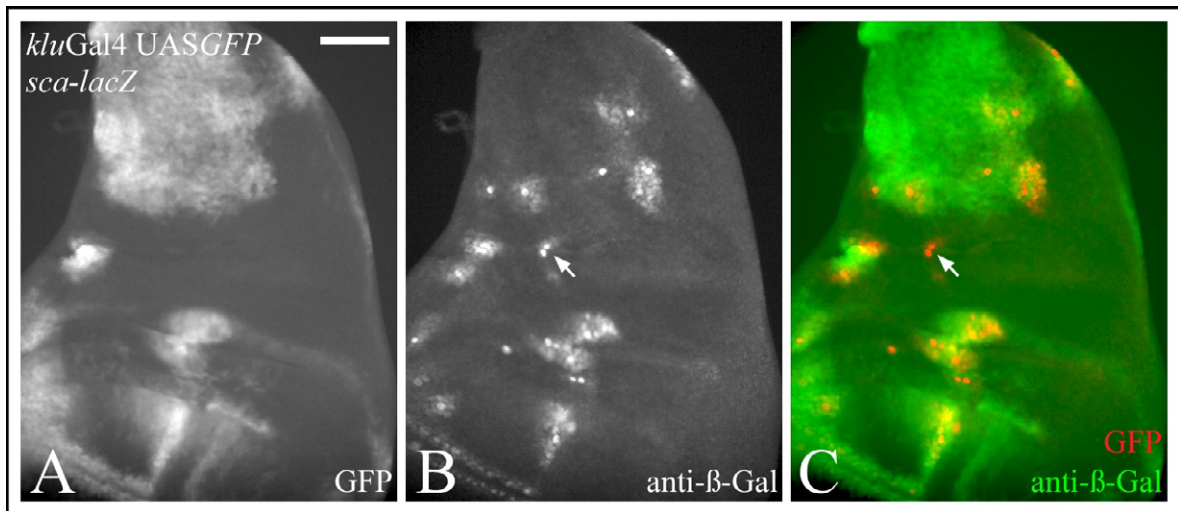
Ein weiteres Problem, das durch das Modell der lateralen Inhibition unberücksichtigt bleibt, ist die Tatsache, dass die SOP immer an exakt der gleichen Position im Cluster gebildet wird (Huang et al., 1991). Es ist davon auszugehen, dass neben dem positiven Rückkopplungsmechanismus noch weitere Faktoren existieren, die die Position der zukünftigen SOP bereits vor dem eigentlichen Selektionsprozess festlegen. Ein Faktor, der an der Positionierung der SOP beteiligt ist, ist *extramacrochaetae* (s. Abschnitt 1.3).

Des Weiteren belegen neuere Untersuchungen, dass die Position der zukünftigen SOP bereits von Anfang an und unabhängig von Notch-Signalweg, präzise im proneuralen Cluster festgelegt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die zukünftige SOP auch dann den neurogenen Entwicklungsweg einschlägt, wenn sie ausschließlich von *Su(H)*-mutanten Zellen umgeben wird, in denen der Notch-Signalweg unterbrochen ist (Koelzer und Klein, 2003). Die mutanten Zellen besitzen ein starkes Potential, andere Zellen zu hemmen, ohne selbst inhibiert werden zu können. Nach dem Modell der lateralen Inhibition würde erwartet, dass die mutanten Zellen die wildtypische Zelle daran hindern, das neurogene Schicksal anzunehmen. Da sich diese Zelle aber dennoch zur SOP entwickelt, ist sie wahrscheinlich bereits von Anfang an immun gegen das inhibierende DI-Signal der benachbarten Zellen und ihre Position ist vermutlich von vornherein festgelegt. Die Aktivität des Notch-Signalwegs würde demnach nur dafür benötigt, dass sich die übrigen Zellen des proneuralen Clusters gegenseitig inhibieren und ihre proneurale Aktivität herabsetzen. Die Determination der SOP erfolgt dagegen durch einen unerwartet genauen und unbekanntem Musterbildungsprozess, an dessen Ende eine Zelle steht, die immun gegen das inhibierende DI-Signal der Nachbarzellen ist. Welche Faktoren diesen Prozess steuern ist bisher nicht bekannt.

## 1.5 Klumpfuß

Ein Faktor, der an der Entwicklung der Borsten beteiligt ist, ist der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *klumpfuß* (*klu*). In vorausgegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein Ausfall von *Klu* zu weniger SOPs und damit zum Verlust von Sinnesborsten führt. Allerdings ist der mutante Phänotyp nicht vollständig penetrant, d.h. es sind immer nur eine geringe Anzahl von Borsten betroffen und die Positionen, an denen die Borsten fehlen, sind variabel. Dennoch legt die vorherige Arbeit nahe, dass *Klu* eine Rolle bei der Determination der SOPs oder der Aufrechterhaltung des Borstenschicksals spielt (Klein und Campos-Ortega, 1997).

Neben der gestörten SOP- bzw. Borstenentwicklung führt der Ausfall von *Klu* zu einer Reihe weiterer Defekte. Während der Embryonalentwicklung kommt es zu Störungen in der Entwicklung des Zellstammbaums einer Neuroblastenlinie, Larven zeigen starke Deformationen der Mundhaken und eine abnorme Morphologie des Gehirns. In adulten Fliegen können neben den fehlenden Borsten auch starke Beindefekte beobachtet werden, die durch Fusionen besonders im Bereich der tarsalen Segmente und durch Deformationen der übrigen Beinsegmente entstehen (Klein und Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997). Zudem zeigen neueste Studien, dass *Klu* auch eine Funktion während der Augenentwicklung besitzt. Es wird beschrieben, dass *Klu* für die gezielte Apoptose



**Abb. 4: Die Expression von *klu* in der Flügelimaginalscheibe während des dritten larvalen Stadiums**

*klu* wird in allen *ac/sc* abhängigen proneuralen Clustern exprimiert. (A) Die Expression von UASGFP unter Kontrolle von *kluGal4*. Das GFP-Expressionsmuster entspricht der normalen *klu*-Expression und kann in den Anlagen des Notums und Scutellums, in der sich entwickelnden Alula und Tegula, in den Anlagen der dritten und vierten Flügelvene, sowie entlang der dorso-ventralen Grenze des Flügelrands detektiert werden. (B) Expression eines *sca-lacZ* Reporterkonstrukts. Die unter der Kontrolle des *sca*-Promotors erfolgte Expression der β-Galaktosidase reflektiert das normale *sca* Expressionsmuster und wurde mit einem anti-β-Galaktosidase (anti-β-Gal) Antikörper nachgewiesen. Als direktes Zielgen von *ac* und *sc* wird *sca* in allen proneuralen Clustern exprimiert. Die Überlagerung beider Kanäle in (C) zeigt, dass sich die Expression von *klu* mit der von *sca-lacZ* in allen *ac*- und *sc*-abhängigen proneuralen Clustern deckt. Einzige Ausnahme sind die in (B) und (C) durch einen Pfeil markierten Zellen, bei denen es sich jedoch nicht um Vorläuferzellen von mechanosensorischen Borsten handelt. Der Balken in (A) entspricht 50µm.

überzähliger Zellen durch eine Herunterregulierung des dEGFR/dRas1-Signalwegs in der pupalen Retina verantwortlich ist (Rusconi et al., 2004).

Die bisherigen Forschungsergebnisse belegen, dass *klu* an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt ist. Ein vollständiger Funktionsverlust dieses Gens führt zu so starken Defekten, dass *klu*-mutante Fliegen semilethal sind, d.h. ein Großteil der Fliegen stirbt bereits während der larvalen bzw. pupalen Phase. Nur ein kleiner Prozentsatz der Tiere überlebt bis zum adulten Stadium, aber auch diese Fliegen sterben kurz nach dem Verlassen der Puppenhülle.

*klu* kodiert für ein Protein mit vier Zink-Fingern des Typs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Die letzten drei dieser Zink-Finger besitzen eine starke Homologie zu den Zink-Fingern der EGR-Transkriptionsfaktoren, weshalb *Klu* ebenfalls zur EGR-Familie gezählt wird (EGR = Early Growth Response) (Klein und Campos-Ortega, 1997). EGR-Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren finden sich vor allem bei Vertebraten und sind dort an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Das Protein aus der EGR-Familie, das mit *Klu* die größte strukturelle Ähnlichkeit aufweist, ist das Wilm`s-Tumor-Suppressor-Protein WT-1, das für verschiedene Differenzierungsschritte während der Gonaden- und Nierenentwicklung der Vertebraten benötigt wird. Ein Ausfall der Genfunktion führt unter anderem zu Nierentumor-

bildung während der Embryonalentwicklung (Klein und Campos-Ortega, 1997; Little et al., 1999; Little und Wells, 1997). Sowohl *klu* als auch WT-1 besitzen einen vierten N-terminal gelegenen Zink-Finger, der sich in seiner Sequenz von den anderen Zink-Fingern unterscheidet. Aufgrund dieser Eigenschaft definieren beide Proteine eine neue Untergruppe innerhalb der EGR-Familie (Klein und Campos-Ortega, 1997).

*klu* wird in allen Entwicklungsphasen in einem komplexen und dynamischen Muster exprimiert. Im Embryo erfolgt die Expression in den meisten Neuroblasten des sich entwickelnden ZNS sowie in breiten lateralen Streifen in der Epidermis. Während der larvalen Entwicklung findet sich das Protein in allen Imaginalscheiben sowie im larvalen Gehirn. Im Rahmen dieser Arbeit ist das Expressionsmuster in der Flügelimaginalscheibe von besonderem Interesse, da hier ein Großteil der Sinnesborsten des PNS angelegt wird. Die Expression beginnt in der Flügelimaginalscheibe während des frühen dritten Larvenstadiums zunächst im Bereich der späteren Flügeltasche. Kurze Zeit später kommt es zu einer Verfeinerung des Expressionsmusters und das Protein ist in den Anlagen der dritten und vierten Flügelvene, in der Region der sich entwickelnden Alula und Tegula sowie entlang der dorso-ventralen Grenze des Flügelrands nachweisbar. Außerdem erfolgt die Expression in breiten Domänen in den Anlagen des Notums und Scutellums (Abb. 4). Somit wird *klu* in allen den Bereichen exprimiert, in denen sich auch die *ac*- und *sc*-abhängigen proneuralen Cluster befinden und die Selektion der SOPs der mechanosensorischen Borsten erfolgt (Abb. 4 C). Bemerkenswerterweise geht die Expression von *klu* der Selektion der SOPs voraus und wird später in den sich differenzierenden SOPs eingestellt, während sie in allen benachbarten Zellen bestehen bleibt (Klein und Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Trotz zahlreicher Arbeiten über die Musterbildung in dem PNS von *Drosophila* sind die Prozesse, die zur Selektion der SOPs und der Bildung der mechanosensorischen Borsten führen, noch nicht vollständig verstanden. Zudem belegen neuere Studien, dass das postulierte Modell der lateralen Inhibition nicht uneingeschränkt gültig ist. Es stellt sich daher die Frage, welche zusätzlichen, bisher unbekanntenen Faktoren neben dem Notch-Signalweg für die Determination der neuronalen Vorläuferzelle in einem proneuralen Cluster benötigt werden.

Ein Faktor, der in dem bestehenden Modell noch nicht berücksichtigt wurde, ist der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *klumpfuss* (*klu*). Die Analyse der *klu*-Mutanten zeigte, dass *klu* entweder bei der Determination der SOPs oder bei ihrer weiteren Differenzierung eine Rolle spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion von *klu* während der Entwicklung des peripheren Nervensystems von *Drosophila* aufgeklärt werden. Insbesondere soll untersucht werden, ob *klu* an der Determination von SOPs beteiligt ist. Dazu sollen zunächst die Auswirkungen der Überexpression von *klu* mittels des UAS/Gal4 Systems (Brand und Perrimon, 1993) analysiert werden. Hierdurch soll u.a. die Frage geklärt werden, ob eine Überexpression von *klu* in der Lage ist, die Ausbildung ektoptischer SOPs zu induzieren. Für das Verständnis der Funktion von Klu ist es wichtig, die Struktur des Proteins zu kennen. Daher sollen durch eine Struktur-Funktionsanalyse die für die Funktion des Proteins wichtigen Domänen identifiziert werden. Außerdem soll mittels heterologer Fusionsproteine (Klu-DNA-Bindungsdomäne + Aktivator- bzw. Repressordomäne) bestimmt werden, ob Klu als aktivierender oder reprimierender Transkriptionsfaktor wirkt. Um die Funktion von *klu* in ein Wirkgefüge einordnen zu können, ist es notwendig, Gene zu identifizieren, die mit *klu* in funktioneller Beziehung stehen. Daher soll der Einfluss von *klu* auf schon bekannte, an der proneuralen Determination beteiligte Gene untersucht werden. Zusätzlich soll versucht werden, neue mit *klu* interagierende Gene zu finden. Die gewonnenen Daten zur Funktion von *klu* während der Selektion der SOP soll zum besseren Verständnis der Musterbildung im PNS von *Drosophila* beitragen.



## 2. Ergebnisse

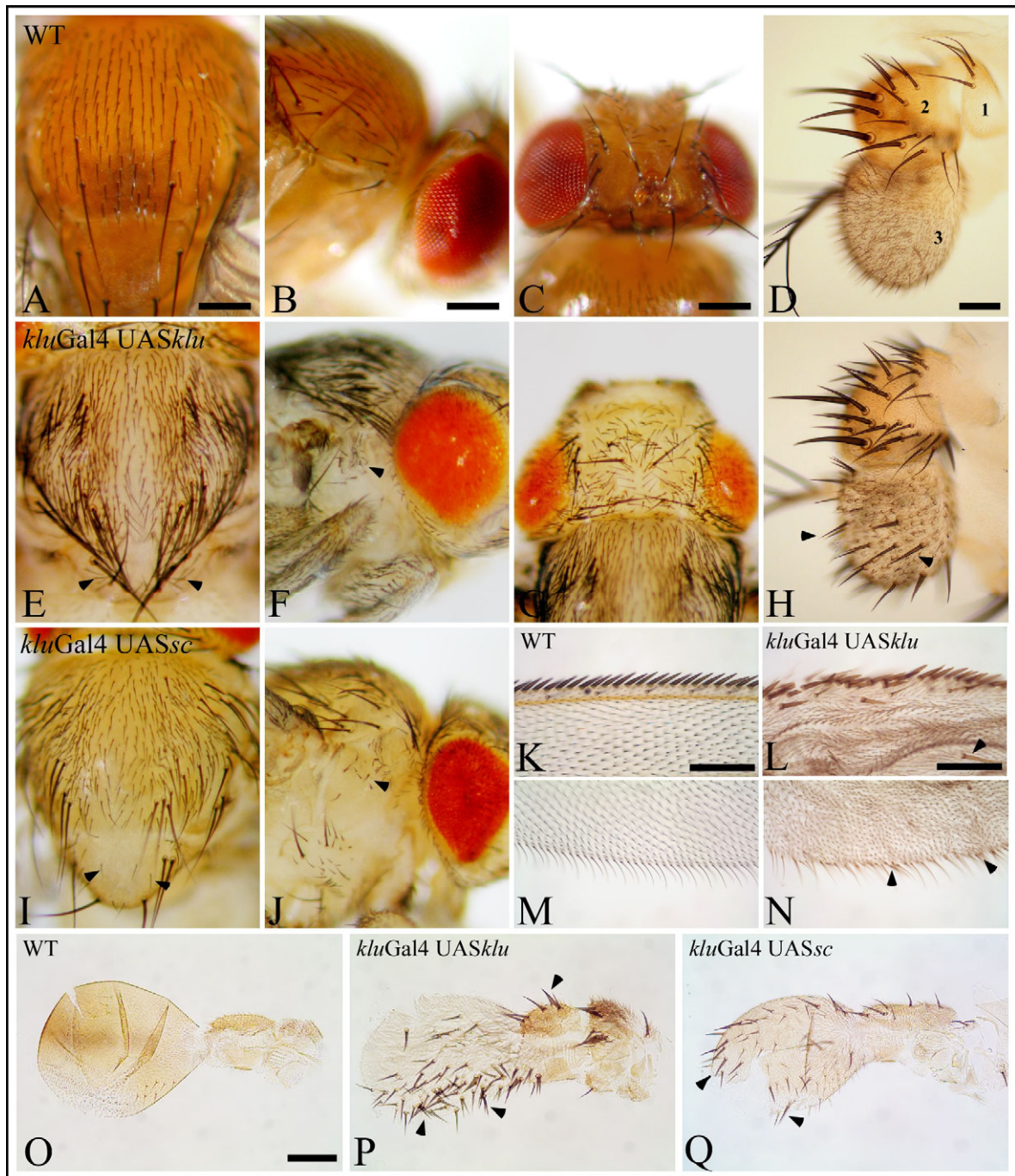
### 2.1 Die Überexpressionsanalyse von Klumpfuss

Durch vorangegangene Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität des Gens *klumpfuss* für die Borstenentwicklung bei *Drosophila* benötigt wird. Ein Ausfall der Genfunktion führt zu einem milden Verlust sensorischer Borsten an verschiedenen Körperstellen der adulten Fliege u.a. im Bereich des Kopfes, des Notums, der Antennen, des vorderen Flügelrands und der Beine (Klein und Campos-Ortega, 1997). Obwohl der Phänotyp nicht vollständig penetrant ist und die betroffenen Bereiche variieren können, fehlt jeder *klu*-mutanten Fliege eine signifikante Anzahl sensorischer Borsten und zwar sowohl Micro- als auch Macrochaeten. Die weitere Analyse ergab, dass in *klu*-mutanten Flügelimaginalscheiben nur noch eine reduzierte Anzahl an SOPs nachgewiesen werden konnte. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Störung in einem sehr frühen Stadium der Borstenentwicklung auftritt. Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass *klu* entweder an der Determination der SOPs oder bei ihrer weiteren Differenzierung beteiligt ist.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können und weiteren Aufschluss über die Funktion des Gens zu erhalten, wurde zunächst eine Überexpressionsstudie mittels des UAS/Gal4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) durchgeführt. Als Aktivatorlinie wurde eine Gal4 Insertionslinie in *klu* verwendet (*kluGal4*), deren Expression unter der Kontrolle des *klu*-Promotors steht und die eine zu *klu* identische Expression von UAS-Konstrukten bewirkt. Dadurch wurde die Expression von *klu* gezielt nur in den Zellen erhöht, die auch im Wildtyp *klu* exprimieren, so dass es sich um eine reine Überexpression handelte.

#### 2.1.1 Die Überexpression von *klu* führt zu mehr mechanosensorischen Borsten

Die Überexpression des UAS-*klu* Transgens unter Kontrolle von *kluGal4* führte zu Semiletalität und war stark dosissensitiv. Bei einer Temperatur von 25°C erreichten nur wenige Individuen das adulte Stadium und starben entweder noch in der Puppenhülle oder kurz nach ihrem Verlassen. Eine Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 27°C führte sogar zu einer vollständigen embryonalen Letalität. Zudem war die Expression anderer UAS-*klu* Linien bereits bei 18°C embryonal letal. Es ist daher davon auszugehen, dass der im Folgenden beschriebene adulte Phänotyp einen intermediären Phänotyp darstellt. Die Individuen, die bei der Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* bei 25°C das adulte Stadium erreichten, zeigten eine dramatische Zunahme in der Anzahl der gebildeten



**Abb. 5: Die Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* führt zur Bildung überzähliger und ektopischer mechanosensorischer Borsten auf dem Körper des Imagos von *Drosophila melanogaster***

(A-D, K, M, O) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten in einer wildtypischen Fliege. In *Drosophila* werden die mechanosensorischen Borsten in einem konstanten stereotypen Muster angelegt. Borstenmuster auf Notum (A), Pleura (B), Kopf (C), Antenne (D), vorderer (K) und hinterer (M) Flügelrand und Haltere (O).

(E-H, L, N, P) Borstenmuster in den gleichen Bereichen in einer Fliege, in der UAS-*klu* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. Bei Überexpression von *klu* kommt es in allen gezeigten Bereichen zu einer deutlich verstärkten Borstenbildung. (E) Auf dem Notum führt die Überexpression von *klu* zur Bildung zahlreicher überzähliger Macro- und Microchaeten (vgl. mit A). Auf dem angrenzenden Scutellum bilden sich zahlreiche ektopische Microchaeten (Pfeilköpfe in E). Außerdem kommt es zur Bildung ektopischer Borsten in Bereichen, in denen normalerweise keine Borsten zu finden sind z.B. der Pleura (Pfeilköpfe in F vgl. mit B) und dem dritten antennalen Segment (Pfeilkopf in H). In diesem Segment befinden sich im Wildtyp (3 in D) ausschließlich die Sensillen des olfaktorischen Systems. (Fortsetzung auf folgender Seite)

Der Vergleich von (K) und (L) zeigt weiter, dass bei der Überexpression von *klu* auch am vorderen Flügelrand und auf dem Flügel zusätzliche Borsten gebildet werden (Pfeilköpfe in L). Außerdem kommt es zu einer vermehrten Bildung von nicht innervierten Borsten am hinteren Flügelrand (Pfeilköpfe in N). (I, J) Die Überexpression des proneuralen Gens *sc* mit *kluGal4* führt zu einem ähnlichen Borstenphänotyp. Auch hier werden zahlreiche zusätzliche und ektopische Borsten gebildet (Pfeilköpfe in I, J vgl. mit E, F). (O-Q) Ektopische Borsten sind auch auf den Halteren von Fliegen zu finden in denen entweder UAS-*klu* oder UAS-*sc* überexprimiert wurde. Der Balken in (A-C) entspricht 200µm, in (D) 50µm, in (K, L, O) 100µm.

mechanosensorischen Borsten in allen Bereichen des Körpers. Insbesondere auf dem Notum bildeten sich viele überzählige Macro- und Microchaeten (Abb. 5 E). Auf dem angrenzenden Scutellum, auf dem normalerweise nur 4 Macrochaeten angelegt werden, (Abb. 5 A) führte die Überexpression von *klu* zur Entstehung zahlreicher Microchaeten (Pfeilköpfe Abb. 5 E). Aber auch in Bereichen des Kopfes (Abb. 5 G), der Antennen (Abb. 5 H) und der Beine (Daten nicht gezeigt) war eine vermehrte Borstenbildung zu beobachten. Ektopische Borsten fanden sich auch auf den Flügeln. Hier hatte die Überexpression von *klu* die Bildung ektopischer Borsten am anterioren Flügelrand und auf dem Flügel zur Folge (Pfeilköpfe Abb. 5 L), führte aber auch zu einer Zunahme von nicht innervierten Borsten am hinteren Flügelrand (Pfeilköpfe Abb. 5 N).

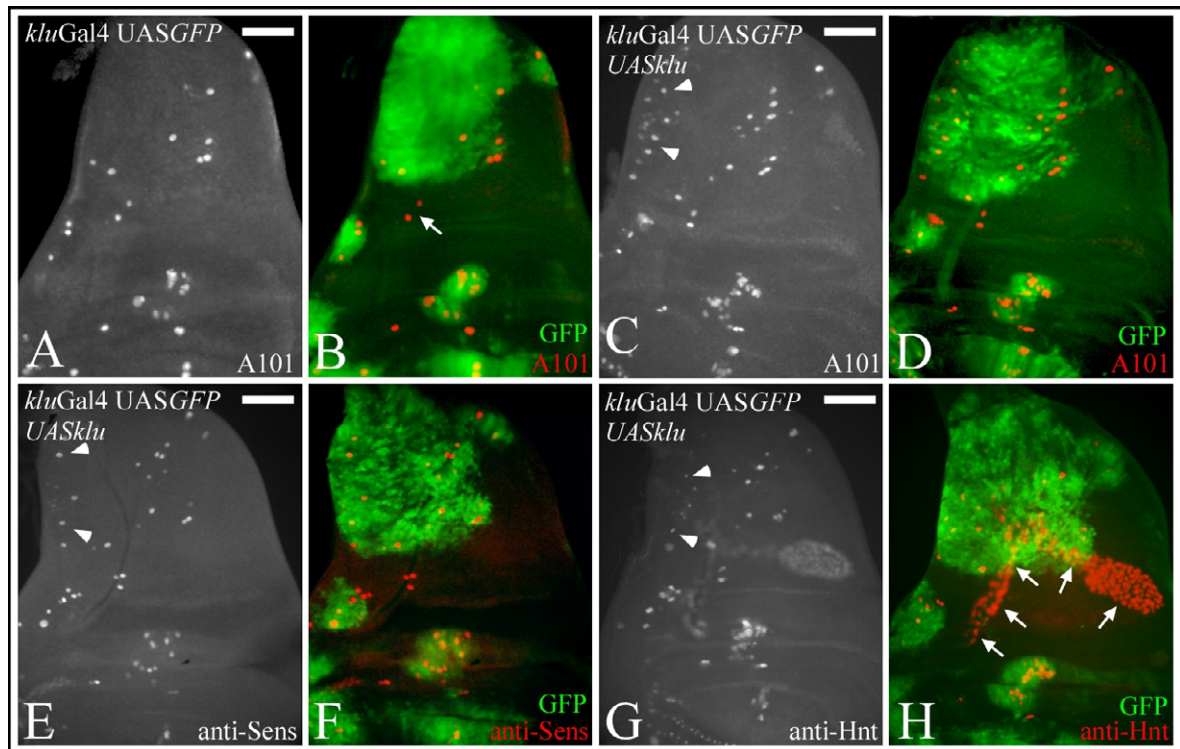
Zusätzlich zu den genannten Bereichen kam es zur Bildung weiterer ektopischer Borsten an Körperstellen, an denen normalerweise keine Borsten gebildet werden. Hierzu zählt die Region des mesothoracalen Episternums (Pfeilkopf Abb. 5 F, vgl. mit Abb. 5 B), das dritte Segment der Antenne (vgl. Abb. 5 H mit D) und die Halteren (vgl. Abb. 5 P mit O).

Auf den Halteren wird die Bildung der mechanosensorischen Borsten normalerweise durch die Aktivität des homöotischen Gens *Ubx* verhindert, indem es die Expression der proneuralen Gene inhibiert (Weatherbee et al., 1998). In ähnlicher Weise wird die Borstenbildung im dritten antennalen Segment durch das proneurale Gen *amos* unterdrückt (zur Lage et al., 2003). Durch eine Überexpression von *klu* scheinen diese inhibitorischen Effekte umgangen werden zu können.

Zu Vergleichszwecken wurde das bekanntermaßen an der Borstenbildung beteiligte proneurale Gen *sc* unter gleichen Bedingungen ebenfalls mit *kluGal4* überexprimiert. Auch hier konnte die Ausbildung zahlreicher überzähliger Borsten an zum Teil ektopischen Positionen beobachtet werden. Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, sind die durch eine Überexpression von *klu* bzw. *sc* erzeugten Borstenphänotypen sehr ähnlich (vgl. Abb. 5 E+F mit I+J). Allerdings scheint bei der Überexpression von *klu* im Vergleich zur Überexpression von *sc* die Anzahl der gebildeten Borsten noch höher zu sein.

### 2.1.2 Die Überexpression von *klu* beeinflusst die SOP-Bildung

Die bisherigen Ergebnisse, insbesondere die Ausbildung ektopischer Borsten, legen nahe, dass *klu* nicht an der Differenzierung, sondern an der Determination der SOPs



**Abb. 6: Die Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* führt zur Induktion überzähliger SOPs**

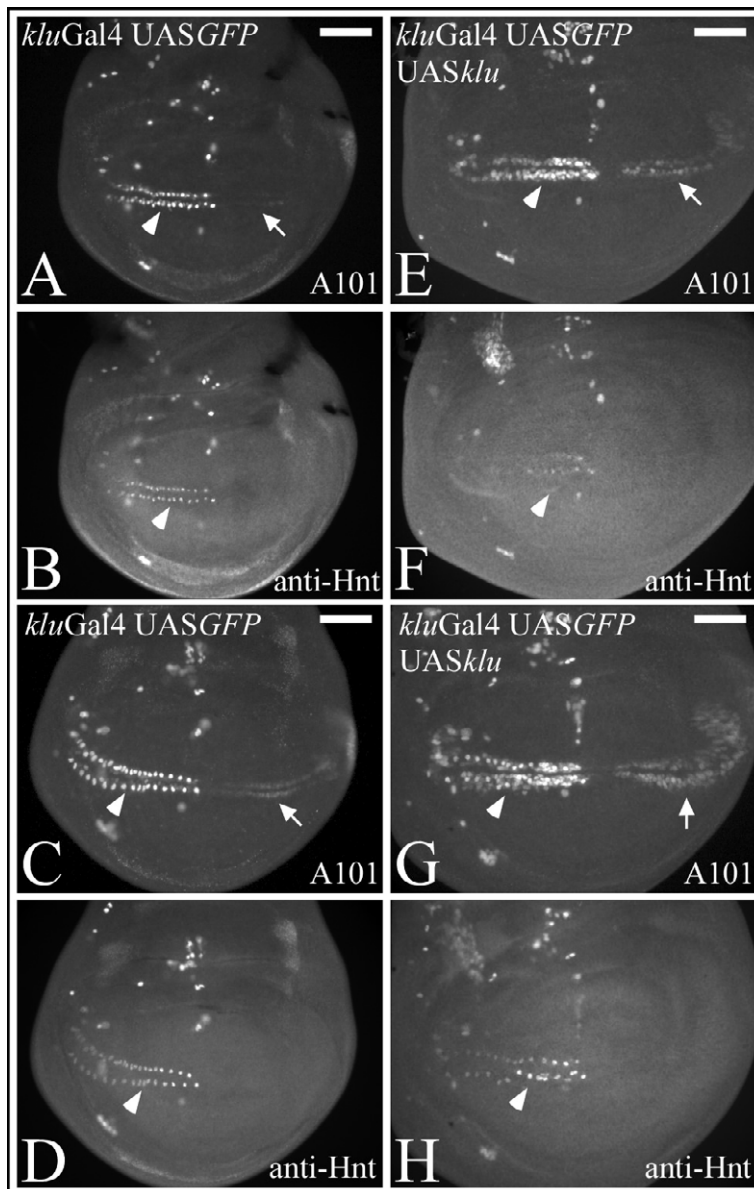
Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen entweder nur UAS-GFP oder UAS-GFP zusammen mit UAS-*klu* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. In den Scheiben wurde die SOP-Bildung durch Färbungen mit Fluoreszenzantikörpern gegen spezifische SOP-Marker nachgewiesen. Die durch *kluGal4* aktivierte Expression von UAS-GFP repräsentiert das normale *klu*-Expressionsmuster. In (B, D, F und H) wurde der GFP-Kanal (grün) mit dem Kanal für die jeweiligen SOP-Marker (rot) überlagert. (A, B) Das wildtypische Muster der SOPs in einer Flügelimaginalscheibe, nachgewiesen durch eine Antikörperfärbung gegen A101-lacZ. Angefärbt sind die SOPs der Macrochaeten, die stets in einem konstanten, reproduzierbaren Muster angelegt werden. Der Pfeil in (B) verweist auf die einzigen zwei SOPs, die sich außerhalb der *klu*-Expressionsdomäne bilden. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um Vorläuferzellen von mechanosensorischen Borsten. (C-H) Die Bildung der SOPs in *klu*-überexprimierenden Scheiben nachgewiesen durch Antikörperfärbungen gegen A101-lacZ (C, D), Sens (E, F), und Hnt (G, H). In allen Fällen kommt es zur Bildung überzähliger, ektopischer SOPs innerhalb der Expressionsdomäne von *klu*. Die Pfeilköpfe in (C, E, G) deuten auf SOPs in Bereichen, in denen im Wildtyp SOPs erst in späteren Stadien entstehen (vgl. mit A). Durch die Überexpression von *klu* wird die Bildung der SOPs vermutlich beschleunigt.

(G, H) Bei der Antikörperfärbung gegen Hnt werden nicht nur die SOPs, sondern auch die Zellen der Tracheen und des Luftsacks angefärbt (Pfeile in H). Diese befinden sich jedoch häufig in einer anderen Fokusebene als die SOPs und können daher eindeutig von den SOPs unterschieden werden.

Der Balken in (A, C, E, G) entspricht 50µm.

beteiligt ist. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die SOP-Bildung unmittelbar in der Flügelimaginalscheibe analysiert. Der Nachweis der SOPs erfolgte mittels Antikörperfärbung gegen spezifische Marker, die ausschließlich in der SOP exprimiert werden. Hierzu zählen die Proteine Hindsight (Hnt), Senseless (Sens) und eine LacZ-Insertion in dem Gen *neuralized* (A101-lacZ) (Koelzer und Klein, 2003). Die Abbildungen 6 C-H zeigen Flügelimaginalscheiben, in denen UAS-*klu* mittels *kluGal4* überexprimiert wurde. Zum Nachweis der *klu*-Expressionsdomäne wurde neben UAS-*klu* auch noch ein UAS-

GFP Konstrukt exprimiert. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6 A, B) wird deutlich, dass bei der Überexpression von *klu* zahlreiche ektopische SOPs gebildet werden. Die Überlagerung beider Kanäle zeigt, dass sich das *klu*-Expressionsmuster mit den Bereichen deckt, in denen die ektopischen SOPs gebildet werden (Abb. 6 D, F, H). Einzige Ausnahme sind die beiden Zellen, die in Abb. 6 B durch einen Pfeil markiert sind. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um SOPs von mechanosensorischen Borsten, sondern um Vorläuferzellen von campaniformen Sensillen (Cubas et al., 1991).



**Abb. 7: Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* führt zu beschleunigter Bildung der Vorläuferzellen der nicht innervierten Haare am posterioren Flügelrand**

Der ventrale Teil von Flügelimaginalscheiben in denen entweder nur UAS-GFP (A-D) oder UAS-GFP zusammen mit UAS-*klu* (E-H) unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. In den Scheiben wurde die Bildung der Vorläuferzellen am posterioren Flügelrand durch eine Antikörperfärbung gegen A101-lacZ nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine Färbung gegen den SOP-Marker Hnt durchgeführt. (A, B, E, F) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums. Die Expression beider Marker ist weitgehend auf den anterioren Bereich des Flügelrands beschränkt (Pfeilkopf). Nur in (E) ist eine deutliche A101-Färbung auch im posterioren Bereich des Flügelrands zu finden (Pfeil). Diese Vorläuferzellen der nicht innervierten Haare bilden sich normalerweise erst unmittelbar vor dem pupalen Stadium. Die starke Expression legt nahe, dass die Determination der hier entstehenden Vorläuferzellen früher stattfindet. (C, D, G, H) Imaginalscheiben zum Zeitpunkt der Puppenbildung.

Eine deutliche A101-Expression im posterioren Bereich des Flügelrands ist jetzt auch in der Wildtypscheibe zu erkennen (Pfeil in C). Die Hnt-Färbung bleibt auf den anterioren Bereich beschränkt (Pfeilkopf in D). In der *klu*-überexprimierenden Scheibe (G, H) sind die Verhältnisse ähnlich, jedoch ist die A101-Expression im posterioren Bereich deutlich stärker (Pfeil in G). Der Balken in (A, C, E, G) entspricht 50 µm.

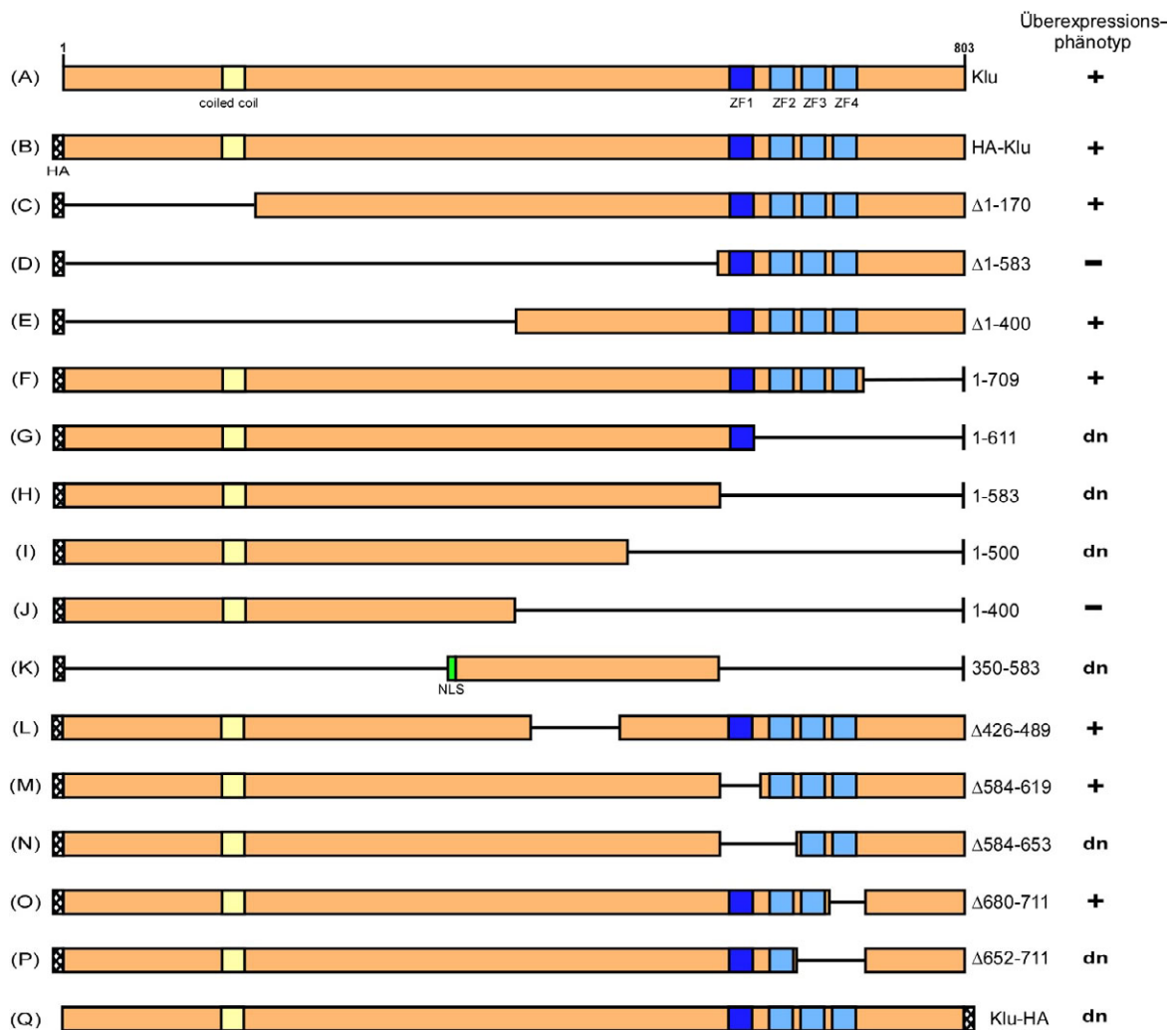
Die Bildung der zusätzlichen SOPs erfolgte nicht homogen in der gesamten *klu*-Expressionsdomäne, sondern bevorzugt in Bereichen, in denen auch im Wildtyp SOPs gebildet werden bzw. in denen sich proneurale Cluster befinden. Eine Region in der besonders häufig ektopische SOPs gebildet wurden, ist die presuturale Region im anterioren Bereich des Notums (vgl. die mit Pfeilköpfen hervorgehobenen Bereiche in Abb. 6 C, E und G mit Abb. 6 A). Im Wildtyp entsteht in dieser Region zwar auch eine SOP (PS), jedoch wird diese erst in der pupalen Phase gebildet.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich in *klu*-überexprimierenden Imaginalscheiben die Vorläuferzellen der nicht innervierten Borsten des posterioren Flügelrands früher und stärker entwickeln. Diese Vorläuferzellen befinden sich an der posterioren dorso-ventralen (d/v) Grenze und bilden sich normalerweise erst kurz vor dem pupalen Stadium. Sie können nur durch eine A101-LacZ- nicht aber durch eine Hnt-Färbung nachgewiesen werden. Der Vergleich von Imaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums zeigt, dass in der Imaginalscheibe, in der *klu* überexprimiert wurde, die Expression von A101 im posterioren Bereich der d/v Grenze bereits eingesetzt hat (Pfeil in Abb. 7 E). In der Wildtypscheibe ist eine derartige Färbung noch nicht nachweisbar (Pfeil in Abb. 7 A), obwohl sie, wie die Hnt-Färbung zeigt, älter ist (vgl. Abb. 7 B und F). Ein entsprechender Phänotyp ist zum Zeitpunkt der Puppenbildung festzustellen. Eine A101-lacZ-Färbung im posterioren Bereich kann jetzt zwar auch in der Wildtypscheibe festgestellt werden (Abb. 7 C), allerdings ist diese Färbung deutlich schwächer als die in der *klu*-überexprimierenden Scheibe des gleichen Alters (Abb. 7 G).

Zusammenfassend haben diese Ergebnisse gezeigt, dass bei Überexpression von *klu* im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr SOPs gebildet werden und dass ihre Determination entweder früher stattfindet und/oder beschleunigt abläuft. *Klu* ist demnach ein Faktor der an der Determination der SOPs beteiligt ist.

## 2.2 Die Funktions-Strukturanalyse von Klumpfuss

Um einen Anhaltspunkt für die mögliche Funktion eines Proteins zu bekommen, ist es wichtig, seine Struktur zu kennen und potentielle funktionale Domänen zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde die Aminosäuresequenz von *Klu* durch einen Vergleich mit anderen Proteinen in der Datenbank auf konservierte, funktionale Domänen hin untersucht. Es zeigte sich, dass *Klu* außer den bereits bekannten vier Zink-Finger-Motiven im C-terminalen Teil nur noch eine potentielle coiled coil-Domäne in N-Terminus besitzt (Aminosäuren 141-160). Ein solches Motiv findet sich in einer Reihe von Proteinen und dient der Protein-Protein Interaktion. *Klu* kann somit grob in zwei Regionen unterteilt werden. Der C-terminale Teil (Aminosäure 584-803) beinhaltet die vier, für die Bindung an



**Abb. 8: Schematische Darstellung der analysierten Klu-Konstrukte und Zusammenfassung ihrer Funktionsfähigkeit in der Überexpressionsanalyse**

Die dargestellten Konstrukte wurden alle als UAS-Transgene stabil ins Genom der Fliegen integriert und durch eine Überexpression mit *klu*Gal4 auf ihre Fähigkeit hin getestet, den Klu-Überexpressionsphänotyp zu erzeugen. +: Überexpression des Konstrukts führt zur Bildung überzähliger Borsten. -: Überexpression des Konstrukts hat keine Auswirkungen auf die Borstenbildung. dn: dominant-negativer Effekt, die Überexpression des Konstrukts führt zum Verlust von Borsten. Bis auf (A) waren alle Konstrukte mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop markiert. Dieses befand sich entweder am N-Terminus (B-P) oder am C-Terminus (Q). (ZF = Zink-Finger, NLS = Kernlokalisierungssequenz)

die DNA benötigten Zink-Finger Motive. Der N-terminale Teil (Aminosäure 1-583) enthält die potentielle coiled coil-Domäne sowie drei potentielle Kernlokalisierungssequenzen (Klein und Campos-Ortega, 1997). Ansonsten konnten keine weiteren bekannten Motive und auch keine offensichtlichen Homologien zu anderen Proteinen entdeckt werden. Daher konnte dem Protein bisher keine Funktion zugeschrieben werden. Um dennoch weiteren Aufschluss über die mögliche Funktion der verschiedenen Bereiche des Proteins zu erlangen, wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt.

Dazu wurden verschiedene *klu*-Konstrukte hergestellt, bei denen der N-Terminus bzw. der C-Terminus sukzessiv verkürzt wurde. In Abb. 8 A-Q sind die *klu*-Konstrukte schematisch

dargestellt. Alle Konstrukte sind N-terminal mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop aus dem Influenza Virus (Wilson et al., 1984) markiert. Dadurch ist es möglich, die rekombinanten Klu-Proteine durch einen spezifischen anti-HA-Antikörper *in vivo* nachzuweisen. Außerdem kann das HA-Epitop für Immunpräzipitationen eingesetzt werden.

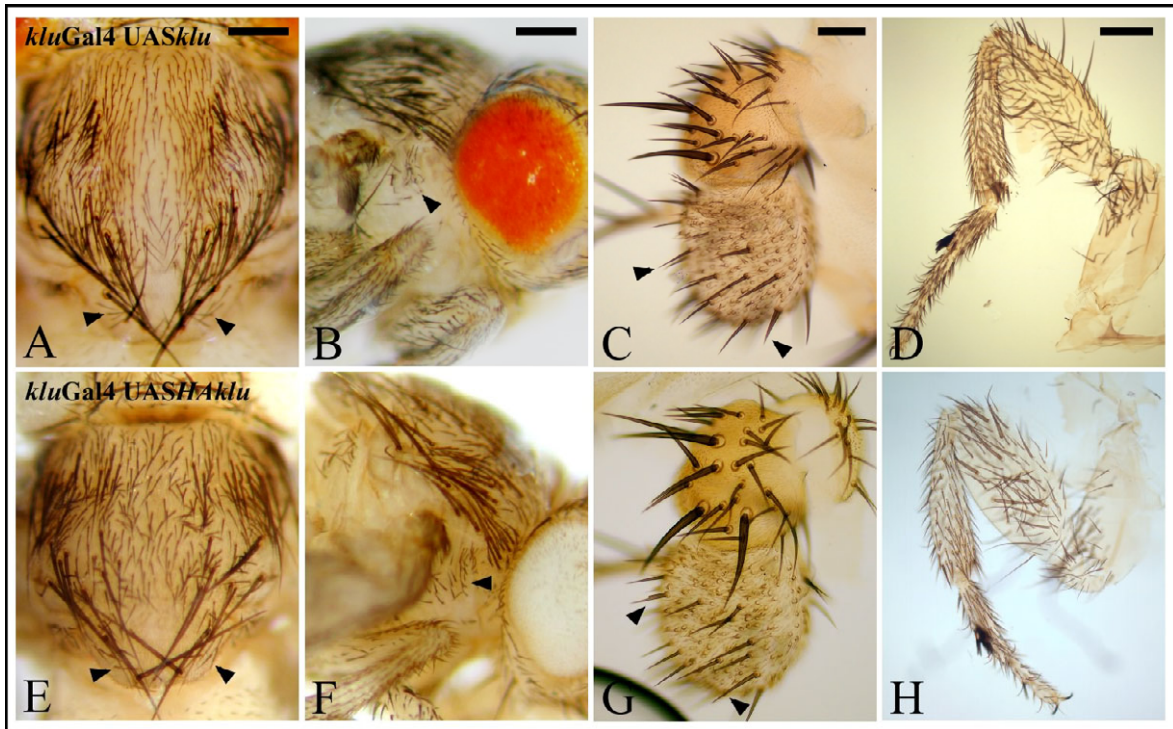
Die Konstrukte wurden als UAS-Transgene stabil in das Fliegen-genom integriert (Rubin und Spradling, 1982) und mittels des UAS/Gal4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) *in vivo* auf ihre Funktion getestet. Als Aktivatorlinie diente die bereits bei den Überexpressionsstudien verwendete *kluGal4*-Linie. Die Funktionalität der Konstrukte wurde anhand ihrer Fähigkeit, überzählige und ektopische Borsten zu bilden, kontrolliert. Als weiteres Kriterium für den Nachweis ihrer Funktion wurde der hervorgerufene Beinphänotyp verwendet. Die Überexpression von *klu* führt normalerweise zu verkürzten, deformierten Beinen mit Fehlbildungen im Bereich der Tibia und des Femurs und Fusionen im Bereich der tarsalen Segmente (Abb. 9). Alle Konstrukte wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, diesen Bein-Phänotyp zu erzeugen.

In einem ersten Experiment sollte zunächst untersucht werden, ob das N-terminale HA-Epitop der Klu-Konstrukte den durch eine Überexpression von *klu* erzeugten Borsten- bzw. Beinphänotyp beeinträchtigt. Dazu wurden die Überexpressionsphänotypen von unmarkierten und HA-markierten *klu* miteinander verglichen. Der Vergleich beider Phänotypen zeigte, dass es auch bei der Überexpression des HA-markierten *klu* zur Ausbildung überzähliger und ektopischer Borsten kommt (Abb. 9 E-H). Ein signifikanter Unterschied in Anzahl oder Position der gebildeten Borsten sowie beim Beinphänotyp konnte nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 9 A-D mit E-H). Die Überexpression von *HA-klu* führte somit zu einem identischen Überexpressionsphänotyp wie die Überexpression von unmarkierten *klu*. Dadurch konnte eine Beeinträchtigung der Klu-Funktion durch das HA-Epitop ausgeschlossen werden.

Leichte Schwankungen in Anzahl und Position der gebildeten überzähligen Borsten sind auf die starke Dosissensitivität von Klu zurückzuführen und kein Anzeichen unterschiedlich starker Funktionalität. Von den 30 getesteten verschiedenen HA-markierten *klu*-Linien waren mehr als die Hälfte bei 25°C embryonal letal. Nur bei wenigen Linien entwickelten sich die Individuen bis zum adulten Stadium. Hier konnten in Abhängigkeit von der verwendeten Linie und Temperatur Schwankungen in Anzahl, Art und Position der zusätzlich gebildeten Borsten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Variante von Klu, die in diesem Zusammenhang getestet wurde, war ein Konstrukt, bei dem das GFP-Markerprotein an den N-Terminus von Klu fusioniert wurde (*UAS-GFP-klu*). Diese Variante ermöglicht einen direkten Nachweis der *klu*-Expression im Gewebe. Wie bereits zuvor für das HA-Klu-Konstrukt gezeigt, hatte auch in diesem Fall die Fusion an den N-Terminus keine Auswirkungen auf die Funktionalität des Proteins.





**Abb. 9: Durch das N-terminal fusionierte HA-Epitop wird Klu in seiner Funktion nicht beeinträchtigt**

Ein Vergleich des Borsten- und Beinphänotyps bei Fliegen, in denen entweder UAS-*klu* der UAS-*HA-klu* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde.

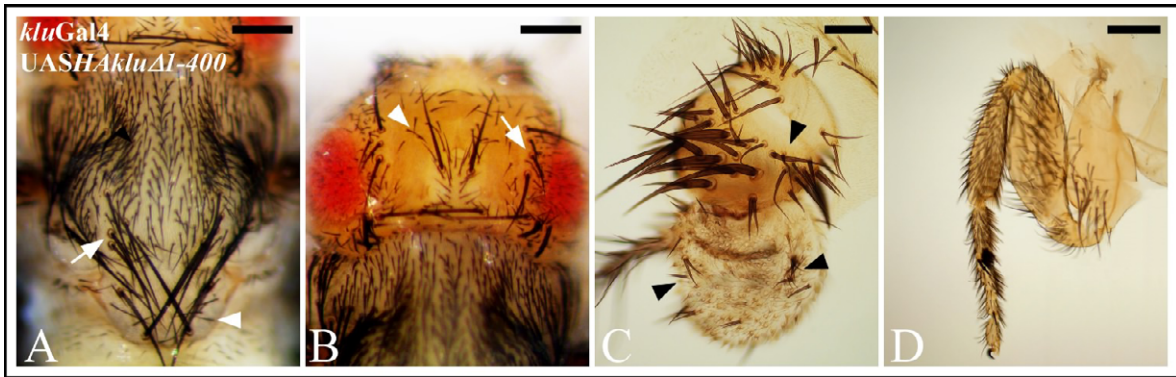
(A-D) Bei der Überexpression von *klu* kommt es in allen gezeigten Bereichen zu einer deutlich verstärkten Borstenbildung (vgl. Abb. 5). An den Beinen führt die Überexpression von *klu* neben den überzähligen Borsten zu Deformationen im Bereich der Tibia und des Femurs, sowie zu Fusionen der tarsalen Segmente. (E-H) Der Borsten- und Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-*HA-klu* überexprimiert wurde. Ein signifikanter Unterschied kann weder bei Anzahl und Position der überzähligen Borsten noch beim Beinphänotyp festgestellt werden. Aufgrund der identischen Überexpressionsphänotypen kann eine Beeinträchtigung der Klu-Funktion durch das HA-Epitop ausgeschlossen werden. Die Pfeilköpfe in A-C bzw. D-G zeigen beispielhaft Positionen, in denen sich ektopische Borsten gebildet haben.

Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.

Die Überexpression von UAS-*GFP-klu* mit *kluGal4* führte ebenfalls zu dem typischen Überexpressionsphänotyp (Daten nicht gezeigt).

### 2.2.1 Die Bedeutung des N-Terminus

In den folgenden Experimenten wurde die Bedeutung des N-Terminus für die Funktionalität des Klu-Proteins untersucht. Dazu wurden zunächst Konstrukte analysiert, bei denen der N-terminale Bereich sukzessiv verkürzt wurde. Es zeigte sich, dass die Deletion der ersten 170 Aminosäuren inklusive der coiled coil-Region (HA-Klu $\Delta$ 1-170) zu keinem messbaren Funktionsverlust des Proteins führte. Sowohl der Borsten- als auch der Beinphänotyp entsprachen dem des vollständigen Proteins (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass die coiled coil-Region für die hier analysierte Funktion von Klu nicht benötigt wird. Eine Verkürzung um weitere 230 Aminosäuren hatte ebenfalls keinen offensichtlichen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins. Wie in Abb. 10 gezeigt, führt



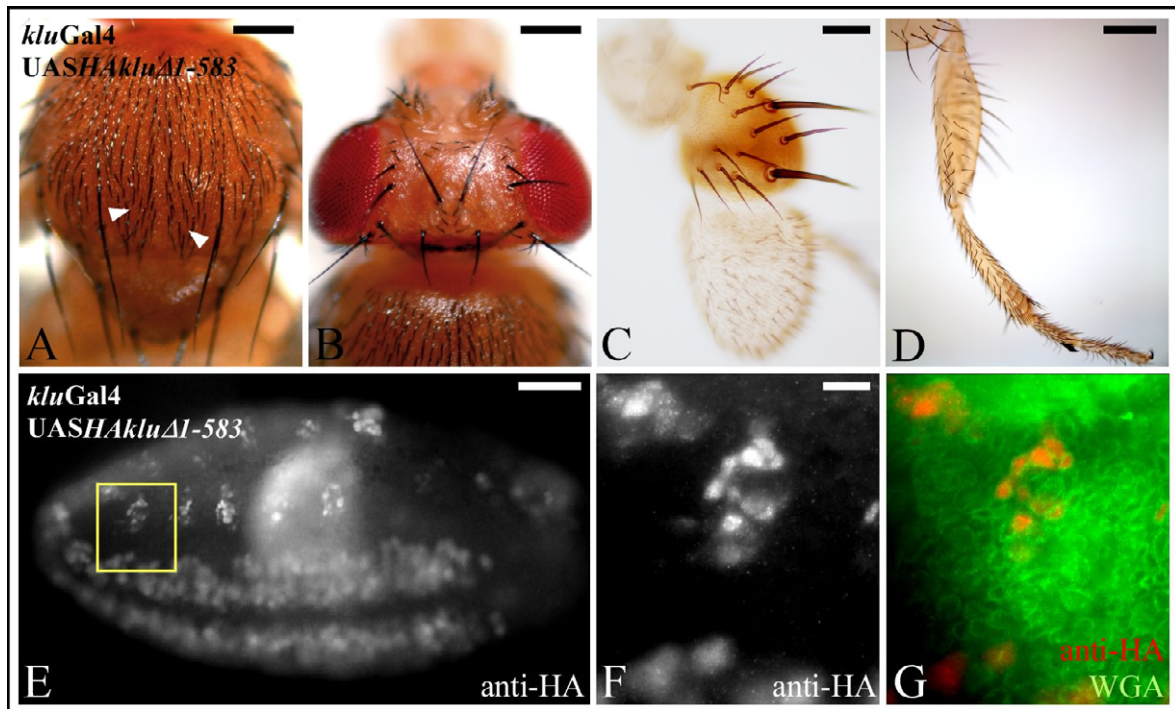
**Abb. 10: Die Deletion der ersten 400 Aminosäuren von Klu hat keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins**

Das Borstenmuster und der Beinphänotyp einer Fliege in der UAS-*HA-kluΔ1-400* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. Bei Überexpression von UAS-*HA-kluΔ1-400* kommt es zu einer deutlich verstärkten und ektopischen Borstenbildung in allen Bereichen des Körpers. Exemplarisch gezeigt sind Notum (A), Kopf (B) und Antenne (C). Ein signifikanter Unterschied zum Überexpressionsphänotyp von UAS-*HA-klu* (Abb. 9) kann weder bei Anzahl und Position der gebildeten überzähligen Borsten noch beim Beinphänotyp (D) festgestellt werden. Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.

die Überexpression von HA-Klu $\Delta$ 1-400 zu dem charakteristischen Borsten- und Beinphänotyp. Ein Unterschied zur Überexpression des vollständigen Proteins ist bei diesem Konstrukt ebenfalls nicht festzustellen (vgl. Abb. 10 mit Abb. 9 A-D). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die ersten 400 Aminosäuren des Klu-Proteins für seine Funktionalität nicht notwendig sind.

Im Gegensatz dazu hat die Deletion des gesamten N-Terminus (HA-Klu $\Delta$ 1-583) einen fast vollständigen Funktionsverlust des Proteins zur Folge. Dies zeigte die Überexpression von HA-Klu $\Delta$ 1-583, die zu keiner großen Änderung in der Anzahl der gebildeten Borsten führte. Sowohl die Antenne als auch der Kopf haben ein wildtypisches Borstenmuster (Abb. 11 B, C). Auf dem Notum werden keine zusätzlichen Macrochaeten angelegt, allerdings bilden sich bei einigen der analysierten Individuen noch vereinzelt ektopische Microchaeten (Pfeilköpfe Abb. 11 A). Die Struktur der Beine ist ebenfalls kaum verändert und sieht beinahe aus wie beim Wildtyp (Abb. 11 D). Insbesondere an Tibia und Femur waren keine auffälligen Deformationen zu erkennen. Im Bereich der tarsalen Segmente waren teilweise noch Fusionen von zwei Segmenten zu beobachten. Der durch die Überexpression von HA-Klu $\Delta$ 1-583 erzeugte Phänotyp ist demnach wesentlich schwächer als der normale *klu*-Überexpressionsphänotyp.

Allerdings wurden durch die Deletion der ersten 583 Aminosäuren auch alle bekannten potentiellen Kernlokalisierungssequenzen entfernt (Klein und Campos-Ortega, 1997). In einem weiteren Experiment musste daher überprüft werden, ob das untersuchte Konstrukt HA-Klu $\Delta$ 1-583 noch im Zellkern lokalisiert ist, oder ob der Funktionsverlust des Proteins möglicherweise auf einer Änderung der subzellulären Lokalisierung zurückzuführen ist. In



**Abb. 11: Die Deletion der ersten 583 Aminosäuren von Klu führt zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust des Proteins, hat aber keinen Einfluss auf dessen Lokalisierung** (A-D) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten und der Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-*HA-kluΔ1-583* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression dieses Konstrukts führt zu keiner großen Änderung der Anzahl der gebildeten Borsten. Kopf (B) und Antenne (C) zeigen ein nahezu wildtypisches Borstenmuster, nur auf dem Notum werden noch vereinzelt ektopische Microchaeten gebildet (Pfeilköpfe in A). (D) Die Struktur der Beine ist nahezu wie beim Wildtyp. Vereinzelt sind Fusionen der tarsalen Segmente zu beobachten. Borsten- und Beinphänotyp legen Nahe, dass die Deletion des gesamten N-Terminus von Klu (As. 1-583) zu einem starken Funktionsverlust des Proteins führt. (E-G) Embryo der UAS-*HA-kluΔ1-583* aktiviert durch *kluGal4* exprimiert. Die Expression des Konstrukts wurde durch eine anti-HA-Antikörperfärbung nachgewiesen. Gleichzeitig wurde die Kernmembran durch Agglutinin angefärbt (WGA). (F und G) Ausschnittsvergrößerung des in (E) markierten Bereichs. (G) Die Überlagerung des HA-Kanals (F) mit dem WGA Kanal zeigt, dass sich trotz der Deletion aller bekannten Kernlokalisierungssequenzen HA-Klu $\Delta$ 1-583 im Kern befindet. Der Balken in (A, B, D) entspricht 200 $\mu$ m, in (C, E) 50 $\mu$ m, in (F) 10 $\mu$ m.

Abb. 11 E-G ist die Lokalisierung von HA-Klu $\Delta$ 1-583 dargestellt. Die Expression wurde mit *kluGal4* aktiviert und das Protein im Embryo durch eine Antikörperfärbung gegen das HA-Epitop nachgewiesen. Gleichzeitig wurde die Kernmembran der Zellkerne mit Agglutinin, einem Lektin aus dem Weizenkeim, das an die Glykoproteine der Kernlamina bindet, sichtbar gemacht. Abb. 11 F, G zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des lateralen Ektoderms. Es ist eindeutig zu erkennen, dass sich das HA-Signal innerhalb des durch Agglutinin angefärbten Rings und damit innerhalb des Zellkerns befindet. Die Deletion der ersten 583 Aminosäuren hat somit keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung des Proteins.

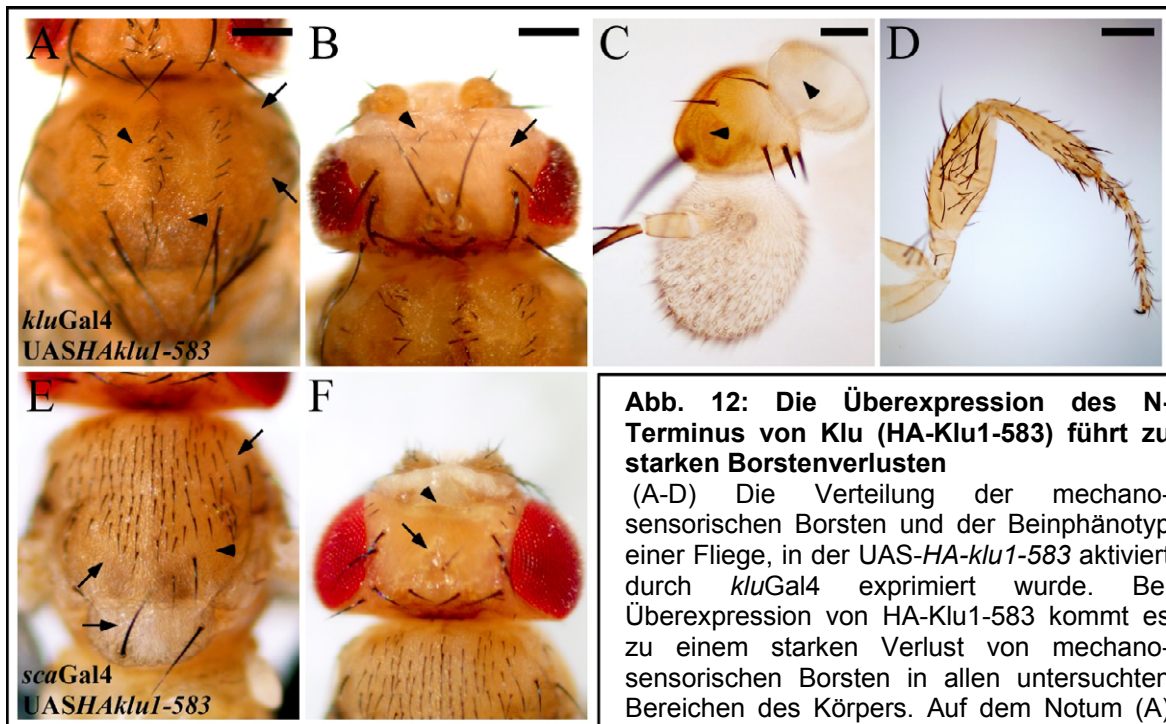
Aus diesem Ergebnis lassen sich zwei Schlussfolgerungen ableiten. Zum einem muss es noch eine weitere, bisher nicht identifizierte Kernlokalisierungssequenz im C-Terminus des

Proteins geben. Zum anderen ist der beobachtete Funktionsverlust von HA-Klu $\Delta$ 1-583 nicht auf eine veränderte subzelluläre Lokalisierung zurückzuführen.

Die Funktionalität von HA-Klu $\Delta$ 1-583 wurde auch in einem weiteren Experiment untersucht, in dem versucht wurde, den *klu*-mutanten Phänotyp durch die Expression dieses Konstrukts zu retten. Ein Ausfall der Klu-Funktion ist normalerweise semiletal, d.h. nur ein sehr geringer Teil der Individuen entwickelt sich bis zum adulten Stadium und verlässt die Puppenhülle (Klein und Campos-Ortega, 1997). Eine Rettung dieser Mutanten durch die Expression von UAS-*klu* mit *kluGal4* ist problematisch, da die Fliegen äußerst empfindlich auf veränderte Klu-Konzentrationen reagieren und die Expression von UAS-*klu*, auch in einem *klu*-mutanten Hintergrund (*klu*<sup>R51</sup>/*kluGal4*) häufig zu einem Überexpressionsphänotyp und damit zu Letalität führt. Im Gegensatz dazu entwickelten sich bei einer Expression von HA-Klu $\Delta$ 1-583 deutlich mehr Individuen bis zum adulten Stadium und waren in der Lage, die Puppenhülle zu verlassen. Diese Fliegen zeigten zwar immer noch die typischen Borstendefekte der *klu*-Mutanten, allerdings waren die Defekte an den Beinen deutlich schwächer (Daten nicht gezeigt). Die höhere Überlebensrate und der schwächere Beinphänotyp deuten darauf hin, dass HA-Klu $\Delta$ 1-583 immer noch eine geringe Restaktivität besitzt. Diese Daten bestätigen somit die Ergebnisse der Überexpressionsstudie.

Zusammenfassend haben die bisherigen Experimente gezeigt, dass große Teile des N-Terminus (Aminosäuren 1-400) für die Funktion von Klu entbehrlich sind, der N-Terminus als Ganzes jedoch von entscheidender Bedeutung für die Erzeugung des charakteristischen Überexpressionsphänotyps ist.

Die besondere Bedeutung des N-Terminus zeigte sich ebenfalls im folgenden Experiment, in dem nur der N-terminale Teil von Klu ohne die Zinkfinger überexprimiert wurde. Die Expression dieser als HA-Klu1-583 bezeichneten Variante führte zu einem starken Verlust von Borsten am gesamten adulten Fliegenkörper und damit zu einem entgegengesetzten Phänotyp der Überexpression des normalen Proteins. Wie in Abb. 12 A gezeigt, kommt es auf dem Notum zu einer drastischen Reduktion der gebildeten Microchaeten. Sie werden nur noch vereinzelt in drei dünnen Reihen angelegt. Des Weiteren fehlen zahlreiche Macrochaeten, insbesondere die PS-Borste sowie die aSA- und pSA-Borsten fehlen mit vollständiger Penetranz. Dagegen sind die dorsozentralen und scutelaren Macrochaeten nur selten betroffen und fehlen, wenn überhaupt, nur vereinzelt. Im Kopfbereich kommt es zu einem fast vollständigen Verlust aller Microchaeten und einiger Macrochaeten (Abb. 12 B). Die Borsten auf den Antennen fehlen ebenfalls fast vollständig (Abb. 12 C). Der Beinphänotyp ist relativ schwach. Es sind nur leichte Deformationen der Segmente zu erkennen und die Fusionen im tarsalen Bereich sind auf maximal zwei Segmente beschränkt (Abb. 12 D). Dieser durch die Überexpression von HA-Klu1-583 erzeugte



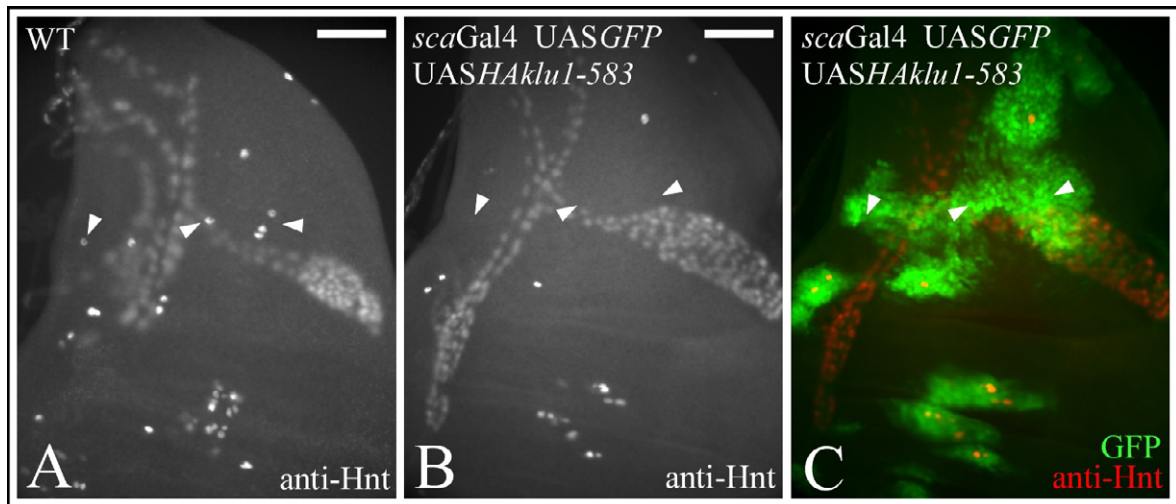
**Abb. 12: Die Überexpression des N-Terminus von Klu (HA-Klu1-583) führt zu starken Borstenverlusten**

(A-D) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten und der Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-*HA-klu1-583* aktiviert durch *kluGal4* exprimiert wurde. Bei Überexpression von HA-Klu1-583 kommt es zu einem starken Verlust von mechanosensorischen Borsten in allen untersuchten Bereichen des Körpers. Auf dem Notum (A) fehlt ein großer Teil der Microchaeten, aber

auch einige Macrochaeten. Ein vergleichbarer Borstenverlust ist auf dem Kopf (B) und an dem 1. und 2. Segment der Antenne (C) zu beobachten. Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Regionen, in denen normalerweise Microchaeten gebildet werden. Die Pfeile verweisen auf Stellen, an denen sich im Wildtyp Macrochaeten befinden (vgl. Abb. 5 A-D). Dieser Borstenphänotyp wird als dominant-negativer Phänotyp bezeichnet. Die Anzahl und Position der fehlenden Borsten kann in Abhängigkeit von Temperatur und verwendeter Aktivatorlinie (s. E, F) schwanken. (D) Der durch die Überexpression von HA-Klu1-583 hervorgerufene Beinphänotyp ist relativ schwach. Das Bein weist nur geringe Deformationen und eine einzelne Fusion im Bereich der tarsalen Segmente auf. (E, F) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten einer Fliege in der UAS-*HA-klu1-583* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *scaGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression mit *scaGal4* führt ebenfalls zu einem starken Verlust von Borsten. Allerdings fehlen bei dieser Aktivatorlinie besonders viele Macrochaeten. Exemplarisch gezeigt sind Notum (E), Kopf (F). Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.

Borstenphänotyp wird im weiteren Verlauf der Arbeit als dominant-negativer Phänotyp bezeichnet.

Wie in den Experimenten zuvor sind auch bei der Überexpression von HA-Klu1-583 in Abhängigkeit von Temperatur und der verwendeten Linie Schwankungen in der Anzahl und Position der fehlenden Borsten zu beobachten. Zudem sind die Stärke des erzeugten Phänotyps sowie das Muster der betroffenen Borsten direkt vom Expressionsmuster der *kluGal4*-Linie abhängig. Dies zeigte sich besonders deutlich, wenn anstelle von *kluGal4* die Treiber-Linie *scaGal4* verwendet wird. Die *scaGal4*-Linie führt u.a. zu einer starken Expression in den proneuralen Clustern der Macrochaeten. Dementsprechend kommt es bei der Expression von HA-Klu1-583 mit *scaGal4* auf dem Notum zu einem fast vollständigen Verlust der Macrochaeten während die Microchaeten weniger stark betroffen sind (Abb. 12 E).



**Abb. 13: Die Überexpression des N-Terminus von Klu (HA-Klu1-583) verringert die Anzahl der gebildeten SOPs in den Imaginalscheiben**

Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen durch eine anti-Hnt-Antikörperfärbung die SOPs nachgewiesen wurden. (A) Die Verteilung der SOPs in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe. (B). Flügelimaginalscheibe in der UAS-*HA-klu1-583* zusammen mit UAS-*GFP* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *scaGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression dieses Konstrukts führt zu dem Verlust der in (A) mit den Pfeilköpfen markierten SOPs. (C) Die *scaGal4* Linie aktiviert die Expression hauptsächlich innerhalb den proneuralen Cluster (grüne Färbung). Die Überlagerung mit dem Hnt-Kanal (rot) zeigt, dass die Positionen, an denen die SOPs fehlen, alle innerhalb der Expressionsdomäne von *scaGal4* liegen.

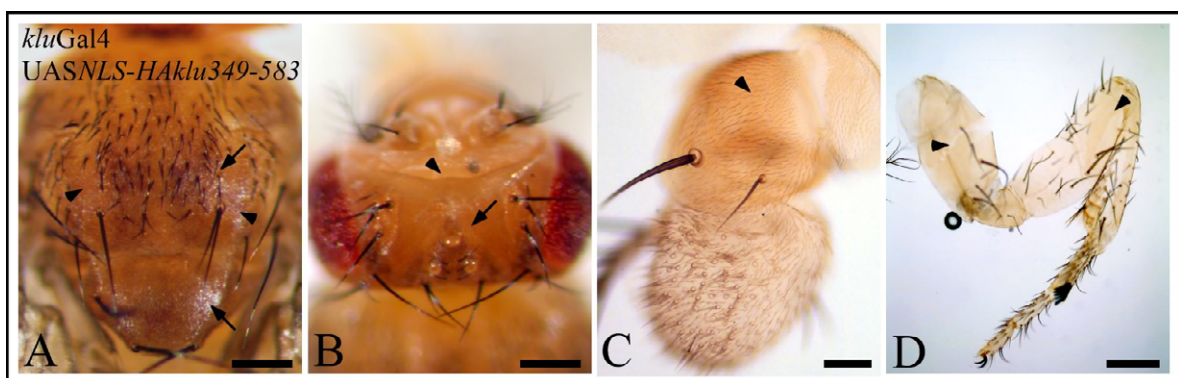
Der Balken in (A, B) entspricht 50µm.

Der durch die Überexpression von HA-Klu1-583 hervorgerufene Verlust von mechanosensorischen Borsten kann auf zwei möglichen Ursachen beruhen. Zu einem kann die Überexpression dazu führen, dass bereits die neuralen Vorläuferzellen der Borsten, die SOPs nicht angelegt werden. Es ist aber auch denkbar, dass es zu einer Fehldifferenzierung der SOPs kommt und damit, ähnlich wie bei einem Ausfall des *Notch*-Gens, eine Neuralisierung des Gewebes erfolgt (Hartenstein und Posakony, 1990). Dies hätte zur Folge, dass anstelle der externen Borstenstrukturen (Borste und Sockelzelle) nur neurales Gewebe gebildet würde. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Anlage der SOPs in Flügelimaginalscheiben untersucht. Dazu wurde das Konstrukt UAS-*HA-klu1-583* und UAS-*GFP* als Marker mit *scaGal4* überexprimiert und die Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums analysiert (Abb. 13). Zum Nachweis der SOPs wurden die Scheiben mit einem Antikörper gegen den SOP-Marker Hnt angefärbt. Das Expressionsmuster von *kluGal4* wurde durch die GFP-Färbung wiedergegeben. Der Vergleich mit einer wildtypischen Scheibe zeigt, dass bei der Expression von UAS-*HA-klu1-583* mit *scaGal4* weniger SOPs gebildet werden (Abb. 13 B, C). Obwohl der Phänotyp nicht vollständig penetrant ist, konnte in den meisten der analysierten Scheiben ein Verlust von mehreren SOP festgestellt werden. Die Expression des N-Terminus von Klu inhibiert somit die Determination der entsprechenden SOPs wodurch es zum Verlust der entsprechenden Borsten kommt.

Dabei ist bemerkenswert, dass der durch die Überexpression des N-terminalen Teils von Klu verursachte dominant-negative Phänotyp wesentlich stärker ist als der Phänotyp, der bei einem Ausfall der Genfunktion von *klu* auftritt. Es kann daher angenommen werden, dass durch die Überexpression des N-Terminus andere, für die Determination der SOPs relevante Proteine in ihrer Funktion negativ beeinflusst werden. Möglicherweise interagiert Klu über seinen N-Terminus mit diesen Proteinen, so dass bei einer Überexpression des N-Terminus diese Proteine in ihrer normalen Funktionsweise gestört werden.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, den Bereich innerhalb des N-Terminus von Klu einzugrenzen, der für die Ausbildung dieses dominant-negativen Phänotyps verantwortlich ist und der möglicherweise für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt wird. Durch die bisherigen Ergebnisse ist bereits bekannt, dass die ersten 400 Aminosäuren für die Funktion von Klu entbehrlich sind. Es ist daher unwahrscheinlich, dass dieser Bereich für eine Protein-Protein-Interaktion relevant ist.

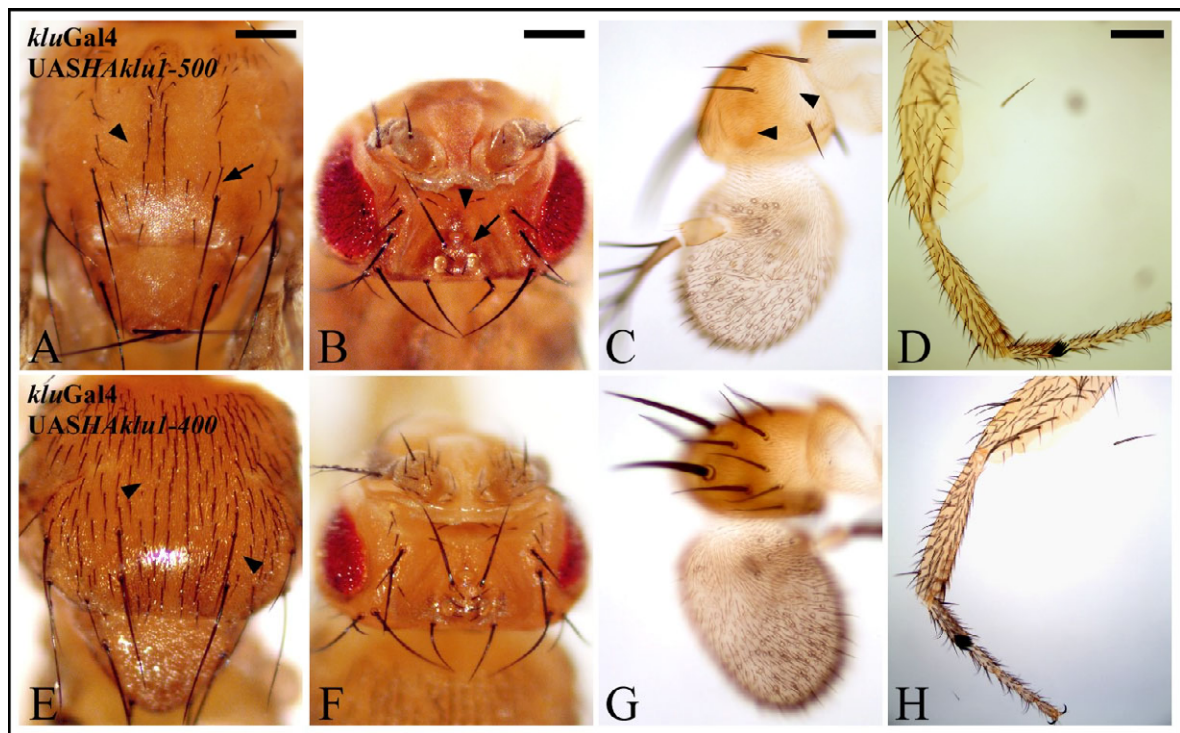
Diese Annahme konnte durch ein Experiment bestätigt werden, bei dem nur ein kurzes Fragment des N-Terminus (HA-NLS-Klu349-583) überexprimiert wurde. Diesem Fragment fehlten sowohl die ersten 348 Aminosäuren als auch der DNA-bindende C-terminale Teil des Proteins. Um eine korrekte subzelluläre Lokalisierung im Zellkern sicherzustellen, wurde das Konstrukt mit der Kernlokalisierungssequenz (nuclear localisation sequence = NLS) (Gorlich und Mattaj, 1996) des SV40-large T-Antigen fusioniert. Die Überexpression dieses kurzen Abschnitts resultierte in einem ähnlichen dominant-negativen Phänotyp wie er bereits für HA-Klu1-583 beschrieben wurde.



**Abb. 14: Die Überexpression von HA-NLS-Klu350-583 führt zu starken Borstenverlusten**  
 (A-D) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten und der Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-*HA-NLS-klu350-583* aktiviert durch *kluGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression dieses Konstrukts führt zu einem starken Verlust von Borsten, ähnlich dem dominant-negativen Phänotyp, der bei der Überexpression von UAS-*HA-klu1-583* entsteht (vgl. Abb. 12). Ein vergleichbarer Verlust von Borsten ist auf Kopf (B) und Antenne (C) festzustellen. Auf dem Notum (A) werden ebenfalls weniger Borsten gebildet, jedoch ist der Verlust geringer als bei HA-Klu1-583. (D) Der Beinphänotyp ist im Gegensatz dazu deutlich stärker, mit offensichtlichen Deformationen und Fusionen im Bereich der tarsalen Segmente. Ob diese Unterschiede von qualitativer Art sind oder auf die dosisabhängige Variabilität der Phänotypen zurückzuführen ist, ist unklar. Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Regionen, in denen normalerweise Microchaeten gebildet werden. Die Pfeile verweisen auf Stellen, an denen sich im Wildtyp Macrochaeten befinden. Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.

Wie in Abb. 14 gezeigt wird, kommt es zu einem starken Verlust sensorischer Borsten an verschiedenen Körperstellen, insbesondere im Bereich der Antenne und des Kopfes. Auf dem Notum fehlen ebenfalls zahlreiche Macrochaeten und einige Microchaeten, allerdings ist im Vergleich zu HA-Klu1-583 die Anzahl der noch gebildeten Microchaeten wesentlich höher. Ob dies ein qualitativer Unterschied ist, oder auf der dosisabhängigen Variabilität der Phänotypen beruht, kann hier nicht abschließend beurteilt werden. Da die Überexpression von HA-Klu349-583 zu einem starken Verlust von Borsten führt, ist davon auszugehen, dass der für die Ausbildung des dominant-negativen Phänotyps relevante Bereich innerhalb der Aminosäuren 349-583 lokalisiert ist.

Um diesen Bereich weiter einzugrenzen, wurden im Folgenden zwei verkürzte Varianten des N-Terminus - HA-Klu1-500 und HA-Klu1-400 - analysiert. Die Überexpression von HA-



**Abb. 15: Der für die Ausprägung des dominant-negativen Phänotyps relevante Bereich liegt zwischen den Aminosäuren 400-500**

(A-D) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten und der Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-HA-*klu1-500* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression dieses Konstrukts führt zu einem vergleichbaren dominant-negativen Phänotyp wie die Überexpression von UAS-HA-*klu1-583* (vgl. Abb. 12) mit starken Borstenverlusten auf Notum (A), Kopf (B) und Antenne (C). Der Beinphänotyp (D) ist relativ schwach. Es kommt nur zu leichten Deformationen der Segmente. (E-H) Das Borstenmuster und der Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-HA-*klu1-400* aktiviert durch *kluGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression dieses Konstrukt hat nur noch geringe Auswirkungen auf die Borstenbildung. Ein Verlust von Borsten kann nur an wenigen Stellen des Notums (E) und des Kopfes (F) festgestellt werden. Der Beinphänotyp (H) ist ähnlich wie in (D) relativ schwach. Die Verkürzung des N-Terminus von 500 auf 400 Aminosäuren verhindert somit die Ausbildung des dominant-negativen Phänotyps. Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Regionen, in denen normalerweise Microchaeten gebildet werden. Die Pfeile verweisen auf Stellen, an denen sich im Wildtyp Macrochaeten befinden.

Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.



Klu1-500 resultierte ebenfalls in dem dominant-negativen Phänotyp und führte zu einem starken Verlust von Borsten (Abb. 15 A-D), vergleichbar mit der Überexpression von HA-Klu1-583 (Abb. 12). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression des um 100 Aminosäuren kürzeren Konstrukts (HA-Klu1-400) nur geringe Auswirkungen auf die Borstenbildung (Abb. 15 E-H). Ein stark ausgeprägter dominant-negativer Phänotyp konnte nicht mehr festgestellt werden, allerdings fehlten an verschiedenen Stellen des Körpers (Kopf, Notum) einige Microchaeten. Insgesamt betrachtet fällt dieser Phänotyp jedoch wesentlich schwächer aus, als der zuvor beschriebene dominant-negative Phänotyp. Auch die Struktur und Form der Beine sind bei der Überexpression von HA-Klu1-400 beinahe wie beim Wildtyp. Diese Ergebnisse sprechen somit für die Annahme, dass der für die Ausbildung des dominant-negativen Phänotyps relevante Bereich und damit der Bereich, der für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt wird, zwischen den Aminosäuren 400 und 500 lokalisiert ist.

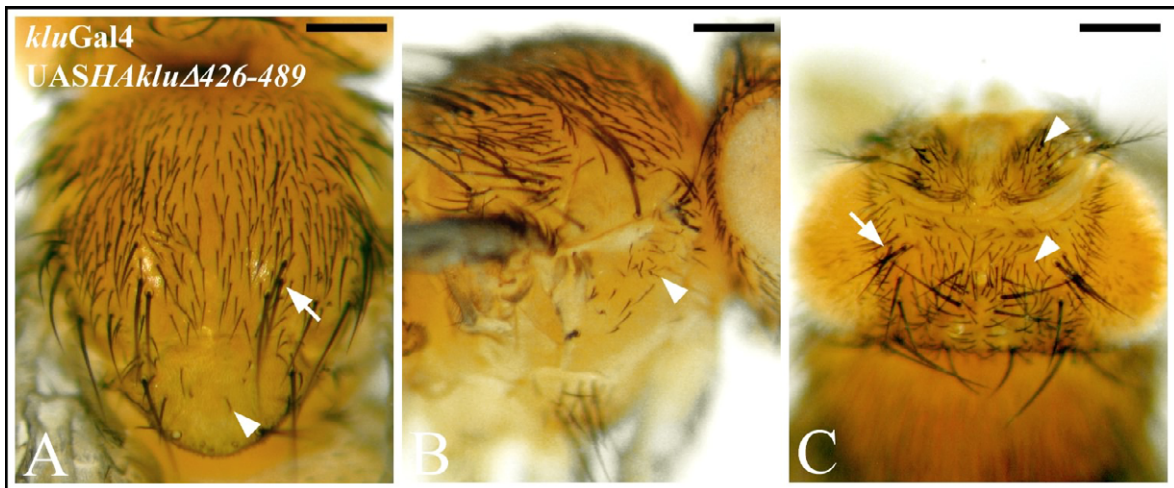
Um weitere Hinweise auf die Funktion dieses Abschnitts zu erhalten, wurde mit Hilfe einer Datenbank-Analyse (Blast: search for short, nearly exact matches; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) untersucht, ob der genannte Bereich Homologien zu anderen Proteinen aufweist. Dieses Programm ermöglicht es, speziell auch kurze Aminosäuresequenzen auf Homologien zu untersuchen, die bei herkömmlichen Datenbankvergleichen unberücksichtigt bleiben.

klu (dm)	429	-DL	CMRNE	VE	PKKYKK	SGSKSS	LESRSAG	MMPPP	PALSA	ASSLESMS	ALSPASS	SSHSG			
sall13 (h)	864	--ENG	SGESD	RLSND	SSAVGD	LESRSAG	----	SPAL	SESSSS	---	QALSP	APSN	NGES		
sall13 (mm)	848	--ENG	SGESD	RLSND	SSAVGD	LESRSAG	----	SPAL	SESSSS	---	QALSP	APSN	NGES		
sall11 (h)	827	--ENG	SI	EGD	VLTND	SSVGG	DMESQ	SAG	----	SPAL	SE	STSSM	--QAL	SPNS	-TQE
sal (gg)	889	-----	SND	SSAVGD	LESQ	SAG	----	SPAM	SESSSS	SM	--QAL	SPVNS	NS	ES	

**Abb. 16: Klu besitzt in seinem N-Terminus kurze zu den Spalt-like Proteinen der Vertebraten homologe Sequenzen**

Gezeigt ist das Ergebnis einer Datenbank-Analyse, in der nach kurzen übereinstimmenden Sequenzabschnitten des N-Terminus von Klu gesucht wurde (für nähere Erläuterungen s. Text). Die Analyse ergab, dass Klu innerhalb des Aminosäureabschnitts 400-500 kurze Sequenzabschnitte enthält, die eine Homologie zu den Spalt-like (Sall)-Proteinen der Vertebraten zeigen. Die entsprechenden Aminosäureabschnitte sind in der Abbildung dargestellt. Identische Aminosäuren sind rot, ähnliche Aminosäuren blau eingefärbt. Abkürzungen: dm = *Drosophila melanogaster*; h = *Human*; mm = *Mus musculus*; gg = *Gallus gallus*

Bei diesem Vergleich wurden einige zu den Spalt-like (Sall)-Proteinen der Vertebraten konservierte Aminosäureabschnitte gefunden (Abb. 16). Die Spalt-like-Proteine der Vertebraten agieren als Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung verschiedener Gewebe wie z.B. Extremitäten, Nieren, Herz und Innenohr (Netzer et al., 2001). Um festzustellen, ob diese Homologien eine signifikante Bedeutung für die Funktion von Klu besitzen, wurde dieser Bereich in einem weiteren Konstrukt deletiert (HA-Klu $\Delta$ 426-489). Bei der Überexpression zeigte sich, dass die Deletion zu



**Abb. 17: Die Deletion der zu den Spalt-like-Proteinen der Vertebraten homologen Sequenzbereiche (As. 426-489) hat keine Auswirkung auf den Überexpressionsphänotyp von *klu***  
 (A-C) Das Borstenmuster einer Fliege in der UAS-*HA-kluΔ426-489* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression des Konstrukts führt zu einer deutlich verstärkten und ektopischen Borstenbildung in allen Bereichen des Körpers und damit zu dem für *klu* charakteristischen Überexpressionsphänotyp. Ein signifikanter Unterschied zur Überexpression von HA-Klu (Abb. 9) kann weder auf Notum (A), Kopf (B) oder Antenne festgestellt werden. Die Deletion der Aminosäuren 426-489 führt demnach zu keinem messbaren Funktionsverlust des Proteins. Die Pfeilköpfe in A-C zeigen beispielhaft Positionen, in denen sich ektopische Borsten gebildet haben. Die Pfeile Verweisen auf ektopische Macrochaeten  
 Der Balken in (A-C) entspricht 200µm.

keinem messbaren Funktionsverlust des Proteins führte. Es bildete sich der typische Überexpressionsphänotyp mit der stark erhöhten Anzahl an Borsten und den typischen Deformationen und Fusionen an den Beinen (Abb. 17 und Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass der in diesem Konstrukt deletierte Bereich (Aminosäure 426-489) und somit die zu den Spalt-like-Protein homologen Sequenzen sehr wahrscheinlich keine entscheidende Bedeutung für die Funktion von Klu besitzen.

Zusammenfassend konnte durch die bisherigen Experimente gezeigt werden, dass der N-terminale Teil als Ganzes eine essentielle Bedeutung für die Funktion von Klu besitzt. Durch die Überexpression des N-Terminus wurde ein dominant-negativer Phänotyp erzeugt, der stärker als der *klu*-mutante Phänotyp ist. Es wird daher angenommen, dass Klu mit anderen für die Determination der SOPs essentiellen Faktoren interagiert. Der Bereich, der wahrscheinlich für diese Interaktion benötigt wird, konnte auf die Aminosäuren 400-500 eingegrenzt werden.

### 2.2.2 Die Bedeutung des C-Terminus und der Zink-Finger

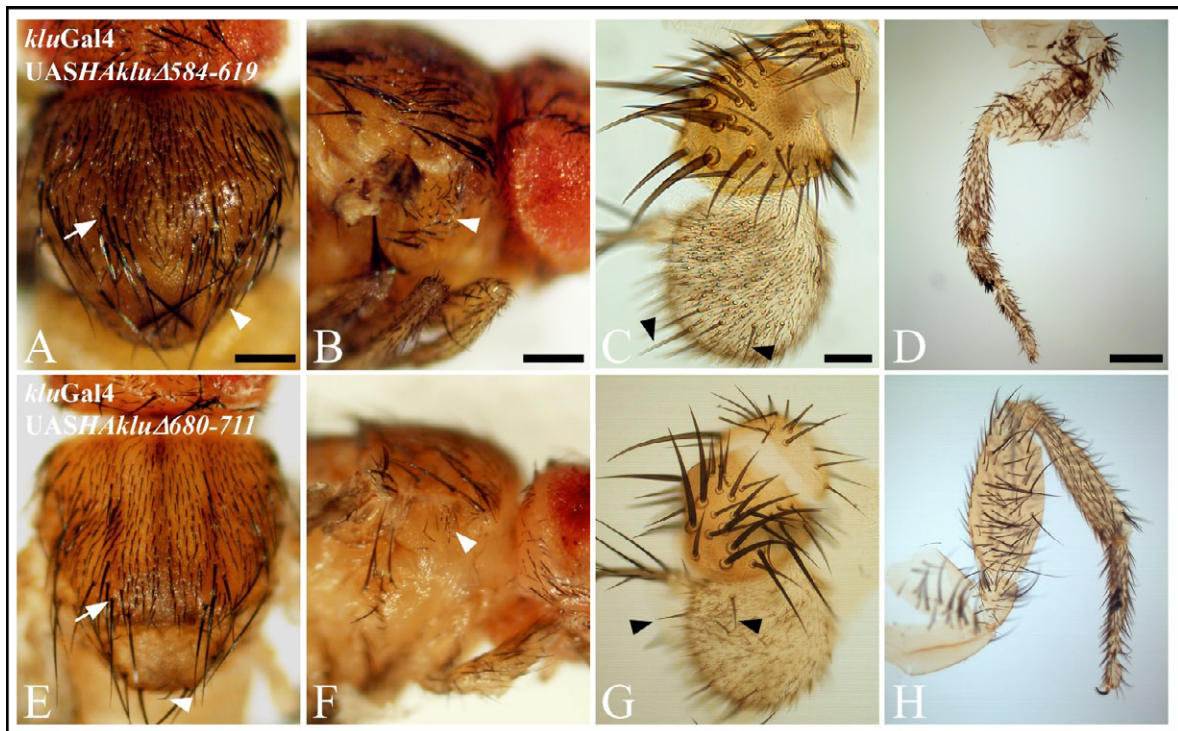
Um die Bedeutung des C-Terminus für die Funktion von Klu zu analysieren, wurde ebenfalls eine Deletionsanalyse durchgeführt. In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression eines Konstruktes mit deletiertem C-Terminus (HA-Klu1-583) zu einem dominant-negativen Phänotyp führte (Abb. 12). Daher kann davon ausgegangen werden, dass der C-Terminus für die normale

Funktionalität des Proteins benötigt wird. Zudem konnte in früheren *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass die Zink-Finger des C-Terminus vermutlich für die DNA-Bindung von Klu verantwortlich sind. In einer Gel-Retentionsanalyse gelang der Nachweis, dass der C-terminale Teil von Klu an eine DNA-Sequenz bindet, die der Konsensussequenz der EGR-Familie entspricht (Thomas Klein pers. Kommunikation, Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den anderen Proteinen der EGR-Familie besitzen Klu und sein nächster Verwandter in der Familie, WT-1, vier anstatt drei Zink-Finger. Bei WT-1 führte dies zu Spekulationen über die Bedeutung der einzelnen Zink-Finger. *In vitro*-Experimente legten nahe, dass verschiedene Dreierkombinationen von Zink-Fingern (Zink-Finger 1-3 oder 2-4) an unterschiedliche Promotorsequenzen binden und dadurch verschiedene Gruppen von Zielgenen differentiell regulieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der erste divergente Zink-Finger nicht nur für die DNA-Bindung benötigt wird, sondern auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. So konnte eine Interaktion zwischen diesem Zink-Finger und dem Tumorsuppressorgen p53 nachgewiesen werden (Maheswaran et al., 1995).

Um die Bedeutung der Zink-Finger für die Funktion von Klu zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten hergestellt, denen unterschiedliche Kombinationen von Zink-Fingern fehlten (Abb. 8 M-P). Zunächst wurden zwei Konstrukte analysiert, denen entweder nur der erste oder nur der letzte Zink-Finger entfernt wurden. Fehlt der erste Zink-Finger (HA-Klu $\Delta$ 584-619) hat dies keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins. Abb. 18 zeigt eine Fliege, bei der das Konstrukt HA-Klu $\Delta$ 584-619 mit *kluGal4* überexprimiert wurde. Die Fliege zeigt alle Merkmale des charakteristischen Überexpressionsphänotyps mit einer massiven Zunahme an ektopischen Borsten (Abb. 18 A-C) sowie dem Auftreten von Deformationen und Fusionen im Bereich der Beine (Abb. 18 D). Ein qualitativer Unterschied zur Überexpression des vollständigen Proteins ist nicht festzustellen (vgl. mit Abb. 9 A-D). Auch konnten keine zusätzlichen oder anderen Phänotypen nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass der erste Zink-Finger für die Funktion von Klu entbehrlich ist und dass eine besondere Funktion dieses Zink-Fingers im Rahmen der Überexpressionsanalyse nicht festgestellt werden konnte.

Ein vergleichbares Ergebnis erhält man bei der Überexpression des Konstrukts, dem nur der vierte Zinkfinger fehlt (HA-Klu $\Delta$ 680-711). Auch in diesem Fall kam es zur Ausbildung des typischen Überexpressionsphänotyps (Abb. 18 E-H). Hier war ebenfalls kein Unterschied zur Überexpression des vollständigen Proteins festzustellen. Der Versuch, mit Hilfe dieses Konstrukts den *klu*-mutanten Phänotyp (*klu*<sup>R51</sup>/*kluGal4*) zu retten, führte zu embryonaler Letalität. Dieser Letalitätsphänotyp ist typisch für starke *klu*-Linien (s.o.) und kann daher ebenfalls als Hinweis für die Funktionalität von HA-Klu $\Delta$ 680-711 angesehen werden.

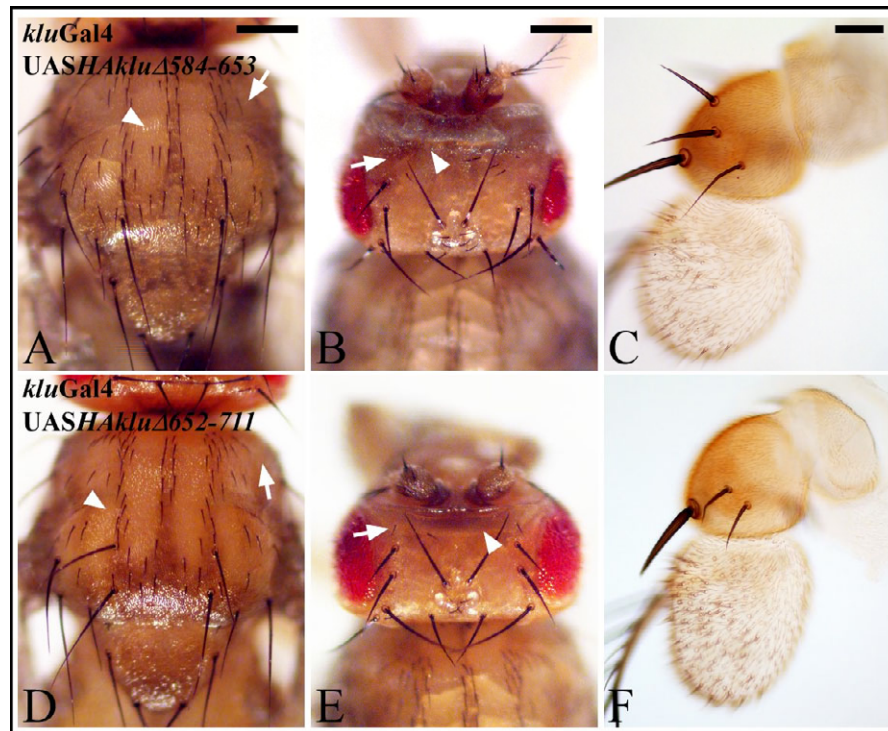


**Abb. 18: Eine Kombination von drei Zink-Fingern (ZF1-3 oder ZF2-4) ist ausreichend für die Funktion von Klu**

(A-H) Verteilung der mechanosensorischen Borsten und der Beinphänotyp von Fliegen, in denen entweder UAS-*HA-kluΔ584-619* oder UAS-*HA-kluΔ680-711* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. (A-D) Bei Überexpression der *Klu*-Variante ohne ZF1 (*HA-KluΔ584-619*) kommt es zu einer deutlich verstärkten und ektopischen Borstenbildung in allen Bereichen des Körpers. Exemplarisch gezeigt sind Notum (A), Pleura (B) und Antenne (C). Ein signifikanter Unterschied zum Überexpressionsphänotyp von *HA-Klu* (Abb. 9) kann weder bei der Anzahl und Position der gebildeten überzähligen Borsten noch beim Beinphänotyp (D) festgestellt werden. Die Deletion des ersten Zink-Fingers hat demnach keinen erkennbaren Einfluss auf die Funktionalität des *Klu* Proteins. (E-H) Ein zu (A-D) vergleichbarer Phänotyp zeigt sich bei der *kluGal4*-abhängigen Überexpression der Variante, der der vierte Zink-Finger fehlt (*HA-KluΔ680-711*). Die Deletion des vierten Zink-Fingers hat ebenfalls keine sichtbaren negativen Auswirkungen auf die Funktionalität von *Klu*. Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Positionen in denen sich ektopische Microchaeten gebildet haben. Die Pfeile verweisen auf ektopische Macrochaeten. Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.

Somit konnte für beide Konstrukte gezeigt werden, dass die Deletion eines einzelnen Zink-Fingers keinen negativen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Das bedeutet, dass das Vorhandensein von drei Zink-Fingern für die Funktion von *Klu* ausreichend ist.

Im Gegensatz dazu hat der Verlust von mehr als einem Zink-Finger drastische Konsequenzen. Sowohl die Deletion der ersten beiden Zink-Finger (*HA-KluΔ584-711*) als auch die Deletion von Zink-Finger drei und vier (*HA-KluΔ652-711*) führten bei einer Überexpression zu einem starken Verlust von mechanosensorischen Borsten (Abb. 19). Es handelte sich dabei um den gleichen dominant-negativen Phänotyp, der bereits bei der Überexpression der Variante ohne Zink-Finger (*HA-Klu1-583*, Abb. 12) zu beobachten war. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass durch den Verlust der beiden Zink-Finger, die Konstrukte nicht mehr an die DNA binden können.

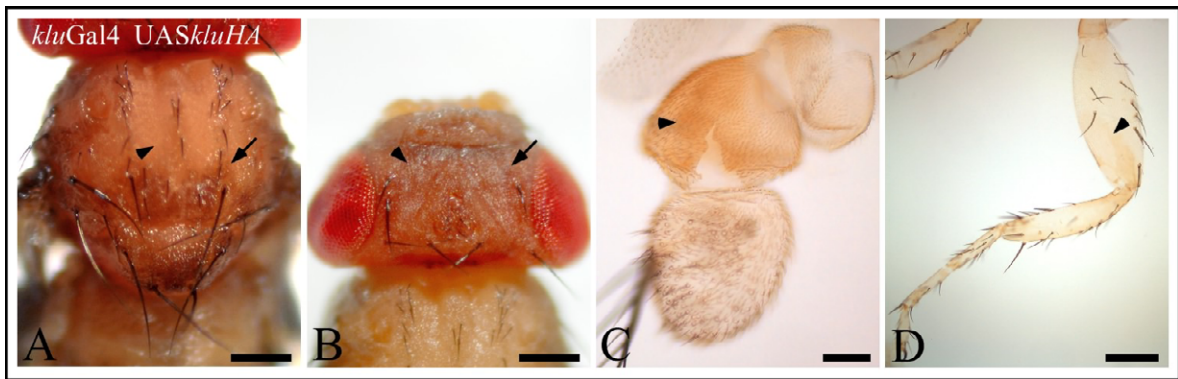


**Abb. 19: Die Überexpression von Klu-Varianten, denen zwei Zink-Finger fehlen (ZF 1+2 oder ZF 3+4) führt zu starken Borstenverlusten**

(A-F) Verteilung der mechanosensorischen Borsten bei Fliegen, in denen entweder UAS-*HA-klu* $\Delta$ 584-653 oder UAS-*HA-klu* $\Delta$ 652-711 unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. (A-C) Bei Überexpression der Klu-Variante ohne ZF1+2 (*HA-Klu* $\Delta$ 584-653) ist ein starker Verlust von Borsten in allen Bereichen des Körpers zu beobachten. Exemplarisch gezeigt sind Notum (A), Kopf (B) und Antenne (C). Die Überexpression dieses Konstrukts führt demnach zu einem Phänotyp analog zu dem dominant-negativen Phänotyp der bei der Überexpression von UAS-*HA-klu*1-583 entsteht (vgl. Abb. 12). (D-F) Ein zu (A-C) vergleichbarer Phänotyp zeigt sich bei der *kluGal4* abhängigen Überexpression der Variante, der die Zink-Finger 3+4 fehlen (*HA-Klu* $\Delta$ 652-711). Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Regionen, in denen normalerweise Microchaetaen gebildet werden. Die Pfeile verweisen auf Stellen, an denen sich im Wildtyp Macrochaetaen befinden. Der Balken in (A, B) entspricht 200 $\mu$ m, in (C) 50 $\mu$ m.

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass der Verlust eines einzelnen Zink-Fingers von dem Protein toleriert wurde. Beide Klu-Varianten mit drei Zink-Fingern waren bei einer Überexpression funktional. Ein signifikanter Unterschied in den Überexpressionsphänotypen war nicht festzustellen. Im Gegensatz dazu führte der Verlust von zwei oder mehr Zink-Fingern zu einem dominant-negativen Phänotyp, vermutlich weil diese Varianten nicht mehr an die DNA binden konnten. Diese Resultate sprechen daher gegen einen differentiellen Gebrauch der Zink-Finger.

Ein weiteres Konstrukt, das in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist, ist eine Variante des vollständigen Proteins, bei dem der C-Terminus mit dem HA-Epitop fusioniert wurde (*Klu-HA*). Die Überexpression dieses Konstrukts führte ebenfalls zu dem dominant-negativen Phänotyp (Abb. 20).



**Abb. 20: Die Überexpression von Klu-HA führt zu starken Borstenverlusten**

(A-D) Die Verteilung der mechanosensorischen Borsten und der Beinphänotyp einer Fliege, in der UAS-*klu-HA* aktiviert durch *kluGal4* exprimiert wurde. Bei Überexpression dieser C-terminal HA-markierten Klu-Variante kommt es zu einem starken Verlust von mechanosensorischen Borsten in allen Bereichen des Körpers. Gezeigt sind Notum (A), Kopf (B), Antenne (C) und Bein (D). Der Borstenphänotyp ist vergleichbar mit dem dominant-negativen Phänotyp, der sich bei der Überexpression des N-Terminus (HA-Klu1-583) ausbildet (vgl. Abb. 12). Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Regionen, in denen normalerweise Microchaeten gebildet werden. Die Pfeile verweisen auf Stellen, an denen sich im Wildtyp Macrochaeten befinden.

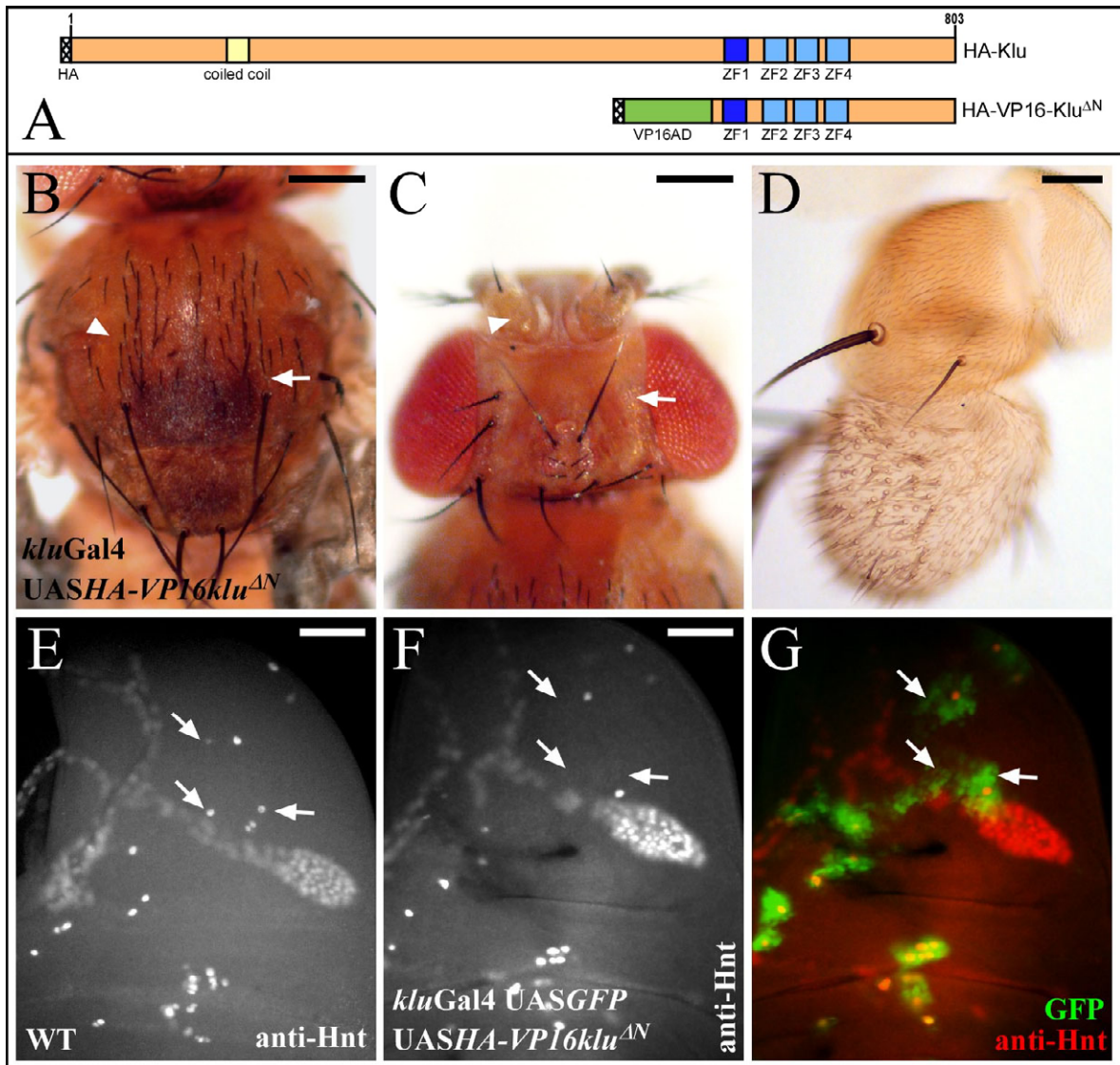
Der Balken in (A, B, D) entspricht 200µm, in (C) 50µm.

### 2.2.3 Analyse der Klu-Funktion mit Hilfe von Fusionsproteinen

Um zu verstehen, wie Klu die Determination der SOPs reguliert, muss zunächst bekannt sein, ob Klu als Repressor oder Aktivator der Transkription agiert.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Fusionsproteine von Klu hergestellt, bei denen der N-Terminus durch eine bekannte Aktivator- oder Repressordomäne ersetzt wurde. Ziel dieses Experimentes war es, Varianten von Klu zu generieren, die entweder als konstitutiv aktiver Aktivator oder Repressor agieren und gleichzeitig über die Zink-Finger-Domäne im C-Terminus an die Zielgene von Klu binden. Durch einen Vergleich der Überexpressionsphänotypen dieser Varianten mit dem Überexpressionsphänotyp von Klu sollten entsprechende Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins möglich sein. Als Aktivatordomäne wurde die virale VP16-Domäne (Aminosäuren 420-657) aus dem *herpes simplex*-Virus verwendet (UAS-HA-VP16Klu<sup>ΔN</sup>). Als Repressordomäne diente die entsprechende Domäne (Aminosäuren 1-297) aus dem Engrailed-Protein von *Drosophila melanogaster* (UAS-HA-enKlu<sup>ΔN</sup>). Beide Varianten wurden jeweils als UAS-Konstrukte stabil in das Genom der Fliegen integriert und mit *kluGal4* überexprimiert.

Die Expression von UAS-HA-VP16Klu<sup>ΔN</sup> führte überraschend zu einem starken Verlust von Borsten und nicht, wie erwartet, zu deren Zunahme. Wie in Abb. 21 B-D gezeigt, ähnelt der erzeugte Phänotyp dem, der bei der Expression der dominant-negativen Varianten gebildet wird (vgl. Abb. 12). Sowohl auf Notum als auch auf Kopf und Antennen war eine starke Abnahme der Anzahl der gebildeten Borsten zu beobachten.



**Abb. 21: Überexpressionsanalyse des Klu-Aktivatorfusionsproteins HA-VP16-Klu<sup>ΔN</sup>**

(A) Schematische Darstellung des HA-VP16-Klu<sup>ΔN</sup> Konstrukts im Vergleich zu Klu. Das Fusionsprotein setzt sich aus dem C-terminalen Teil von Klu (As. 584-803) und der Aktivator-domäne des viralen Proteins VP16 (As. 420-657) zusammen. (B-D) Verteilung der mechanosensorischen Borsten einer Fliege in der UAS-HA-VP16-klu<sup>ΔN</sup> unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. Die Überexpression dieses Fusionsproteins führt zu einem starken Verlust von Borsten. Sowohl auf Notum (B) als auch auf Kopf (C) und Antenne (D) fehlen zahlreiche Micro- und Macrochaeten. Die Pfeilköpfe zeigen beispielhaft Regionen, in denen normalerweise Microchaeten gebildet werden. Die Pfeile verweisen auf Stellen, an denen sich im Wildtyp Macrochaeten befinden. (E-G) Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums, in denen die SOP-Bildung durch eine anti-Hnt-Antikörperfärbung nachgewiesen wurde. (E) Die Verteilung der SOPs in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe. (F) Bei Expression von UAS-HA-VP16-klu<sup>ΔN</sup> mit *scaGal4* wird die Determination von SOPs verhindert und es kommt zum Verlust der in (E) durch Pfeile markierten SOPs. Es wird ein zur Überexpression von UAS-*klu* entgegengesetzter Phänotyp erzeugt (vgl. Abb. 6). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Klu kein Aktivator der Transkription ist.  
Der Balken in (B, C) entspricht 200µm, in (D-F) 50µm.

Allerdings stellt sich auch bei diesem Ergebnis die Frage, ob der Verlust der Borsten auf einer Nichtanlage der entsprechenden Vorläuferzellen beruht oder ob durch die

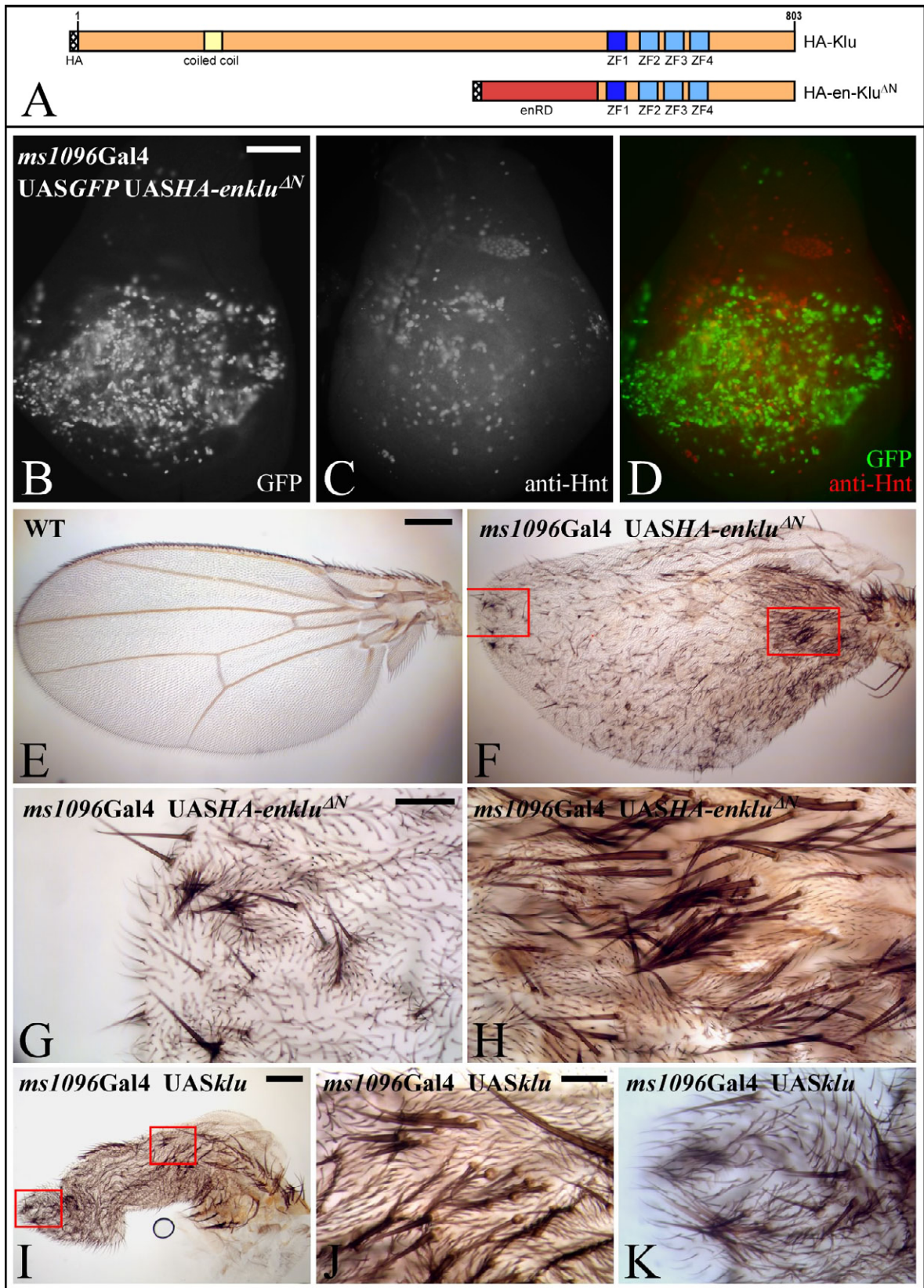
Expression von *UAS-HA-VP16Klu<sup>ΔN</sup>* das Gewebe neuralisiert wird und dementsprechend nur die externen Borstenstrukturen fehlen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde in einem weiteren Experiment die Anzahl der gebildeten SOPs in Flügelimaginalscheiben untersucht. *UAS-HA-VP16Klu<sup>ΔN</sup>* wurde mit *scaGal4* überexprimiert und Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums mit einem Antikörper gegen den SOP-Marker Hindsight angefärbt. Als Marker für die *sca*-Expression diente *UAS-GFP* (grüne Färbung in Abb. 21 G). Der Vergleich mit der wildtypischen Scheibe zeigt deutlich, dass die Anzahl der gebildeten SOPs stark reduziert ist (Abb. 21 E, F). In den durch Pfeile markierten Positionen kann bei einer Überexpression von *UAS-HA-VP16Klu<sup>ΔN</sup>* keine SOP-spezifische Hnt-Färbung mehr nachgewiesen werden. Durch die Expression dieses Konstrukts wird demnach die Determination der SOPs verhindert und ein zur Überexpression von *Klu* entgegengesetzter Phänotyp erzeugt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass *Klu* kein Transkriptionsaktivator, sondern ein Repressor ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde im folgenden Experiment die *Klu*-Variante mit der Repressordomäne analysiert (*UAS-HA-enKlu<sup>ΔN</sup>*).

Es stellte sich jedoch heraus, dass alle transgenen Linien dieses Konstrukts bei einer Expression mit *kluGal4* sowohl bei 18°C, als auch bei 25°C embryonal letal waren und keines der Tiere ein analysierbares Stadium erreichte. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine alternative Gal4-Aktivatorlinie verwendet: *ms1096Gal4*. Diese Aktivatorlinie ist erst während des frühen dritten Larvenstadiums aktiv und führt in der Flügelimaginalscheibe zu einer Expression vornehmlich in der Flügelanlage und des Notums (Abb. 22 B).

Die Expression von *UAS-HA-enKlu<sup>ΔN</sup>* mittels dieser Gal4-Linie resultierte in der Bildung von sehr vielen überzähligen und ektopischen Borsten (Abb. 22 F-H). Insbesondere auf dem Flügel, auf dem normalerweise nur kurze, nicht innervierte Haare vorkommen, bildeten sich zahlreiche ektopische Borsten. Auch im Bereich der Gelenkregion und des proximalen Flügels war eine erhebliche Zunahme von Borsten zu beobachten. Die Untersuchung der entsprechenden Imaginalscheiben ergab eine im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhte Zahl an Hnt-positiven SOPs (Abb. 22 C). Um einen besseren Vergleich der Phänotypen zu ermöglichen, wurde das normale *UAS-klu* ebenfalls mit der *ms1096Gal4* Aktivatorlinie exprimiert. Die Überexpression führte zu einem nahezu identischen Flügelphänotyp. Es bildeten sich ebenfalls zahlreiche ektopische Borsten sowohl auf dem Flügel als auch im Bereich der Gelenkregion (Abb. 22 I-K). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Überexpression des Repressorfusionsproteins *HA-enKlu<sup>ΔN</sup>* die Borstenbildung fördert und einen zur Überexpression von *Klu* vergleichbaren Phänotyp erzeugt. Es muss daher angenommen werden, dass *Klu* entgegen den Erwartungen als Repressor agiert. Um diese Annahme zu bestätigen und den Effekt der



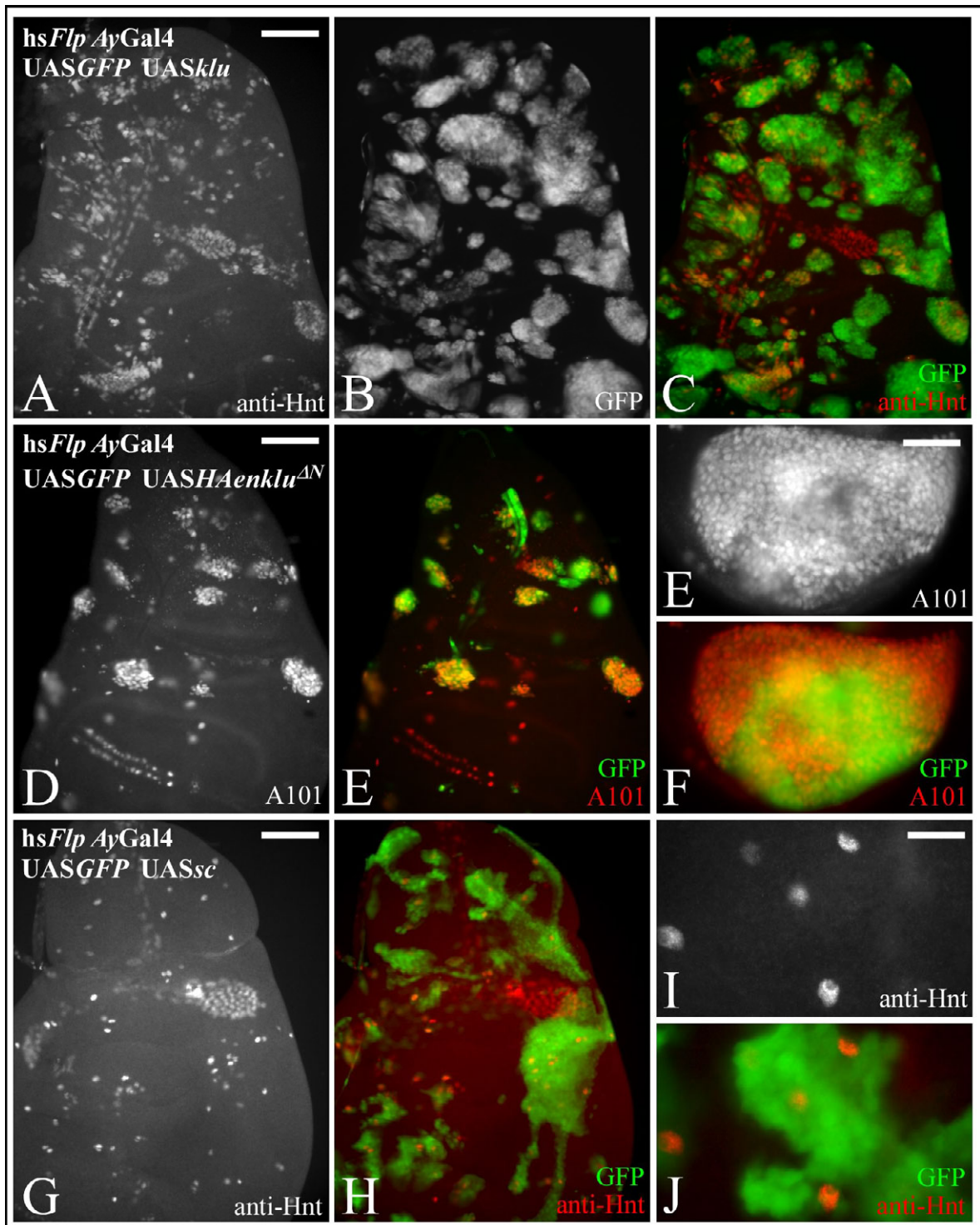


**Abb. 22: Überexpressionsanalyse des Klu-Repressorfusionsproteins HA-enKlu<sup>ΔN</sup>**

(A) Schematische Darstellung des HA-enKlu<sup>ΔN</sup>-Konstrukts im Vergleich zu Klu. Das Fusionsprotein setzt sich aus dem C-terminalen Teil von Klu (As. 584-803) und der Repressordomäne des Engrailed-Proteins (As. 1-297) zusammen. (B-D) Flügelimaginalscheibe des späten dritten Larvenstadiums, in der UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> zusammen mit UAS-*GFP* unter Kontrolle der Aktivatorlinie *ms1096Gal4* exprimiert wurde. Die *ms1096Gal4*-Linie aktiviert die Expression von UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> hauptsächlich in der Flügelanlage (B) und führt dort zur Bildung sehr vieler ektoptischer SOPs (C). (E-H) Vergleich des Borstenmusters eines wildtypischen Flügels mit einem Flügel in dem UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> unter Kontrolle der Aktivatorlinie *ms1096Gal4* exprimiert wurde. (E) Im wildtypischen Flügel werden mechanosensorische Borsten nur am anterioren Flügelrand und in der Gelenkregion gebildet. Auf dem Flügel und am posterioren Flügelrand befinden sich nur nicht innervierte Haare. (F-H) Die Expression von UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> mit *ms1096Gal4* führt zur Bildung einer sehr vieler überzähliger und ektoptischer Borsten, die sich über den gesamten Flügel verteilen. (G, H) Ausschnittsvergrößerungen der in (F) durch einen Rahmen markierten Bereiche. Die Ausschnittsvergrößerung in (G) zeigt den distalen Bereich des Flügels. Es haben sich zahlreiche ektoptische Borsten in einer Region gebildet, in der normalerweise nur nicht innervierte Haare vorkommen. In der Gelenkregion (H) kommt es zur Bildung sehr vieler ektoptischer Borsten, die zum Teil in „Büscheln“ angeordnet sind. (I-K) Die Überexpression von UAS-*klu* mit *ms1096Gal4* führt zu einem sehr ähnlichen, jedoch etwas schwächeren Phänotyp. (I) Obwohl sich der Flügel nicht vollständig entfaltet hat, ist eine große Zahl überzähliger und ektoptischer Borsten zu erkennen. Die Ausschnittsvergrößerungen in (J) und (K) zeigen ähnliche Bereiche wie in (G) und (H). Der Borstenphänotyp dieser Regionen ist bei einer Überexpression von UAS-*klu* fast identisch zur Überexpression des Repressorproteins UAS-*HA-enKlu*<sup>ΔN</sup>. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Klu ein Repressor der Transkription ist. Der Balken in (B) entspricht 50µm, in (E, F, I) 300µm, in (G, H, J, K) 30µm.

Expression von HA-enKlu<sup>ΔN</sup> auch in anderen Bereichen der Flügelimaginalscheibe zu testen, wurden durch eine Kombination von der Flp/FRT-Technik mit dem UAS/Gal4-System (s. Abschnitt 4.7.13) Zellklone induziert, die entweder UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> oder UAS-*klu* konstitutiv exprimierten. Die Klone waren durch die Fluoreszenz von GFP positiv markiert, da parallel zu dem untersuchten Konstrukt UAS-*GFP* als Marker exprimiert wurde. Analysiert wurde die Anzahl der gebildeten SOPs in Imaginalscheiben des dritten Larvenstadiums. Dazu wurden Antikörperfärbungen gegen SOP-spezifische Marker (Hnt oder A101) durchgeführt.

Bereits bei der Expression von UAS-*klu* war ein dramatischer Effekt zu beobachten: Im Vergleich zum Wildtyp kam es zu einer massiven Zunahme von SOPs. Innerhalb der Klone konnte in einer großen Anzahl von Zellen eine SOP-spezifische Färbung detektiert werden (Abb. 23 A-C), d.h. es erfolgte eine erhebliche Transformation von ektodermalen Vorläuferzellen in Zellen mit neuralem Entwicklungsschicksal. Ein vergleichbarer Phänotyp zeigte sich bei der klonalen Expression von UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup>. In Abb. 23 D und E ist eine entsprechende Imaginalscheibe dargestellt. Bereits in der Übersicht ist zu erkennen, dass in den meisten Klonen ein Großteil der Zellen eine für den SOP-Marker A101 positive Färbung aufweist. Das bedeutet, dass bei beiden Konstrukten (UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> bzw. UAS-*klu*) durch eine Überexpression die Bildung ektoptischer SOPs auch in Regionen außerhalb der Flügelanlage induziert werden kann. Aufgrund der Ähnlichkeit der erzeugten Phänotypen muss davon ausgegangen werden, dass beide Konstrukte in



**Abb. 23: Die klonale Überexpression von UAS-*klu* oder UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> führt zur Bildung vieler überzähliger SOPs in allen Bereichen der Flügelimaginalscheibe**  
 Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen entweder UAS-*klu* (A-C), UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> - (D-G) oder UAS-*sc*- (H-K) überexprimierende Klone durch eine Kombination des UAS/Gal4-Systems und Flp/FRT vermittelter Rekombination induziert wurden. Die Klone wurden im ersten Larvenstadium induziert und 72-96 Std. später analysiert. Der Nachweis der SOPs erfolgte entweder durch eine Antikörperfärbung gegen Hnt oder A101. (A-C) Expression von UAS-*klu* in Zellklonen. (A) Eine sehr große Anzahl von Zellen exprimiert den SOP-Marker Hnt. (B) Durch Co-Expression von UAS-GFP sind die Zellklone positiv markiert. (C) Die Überlagerung des Hnt-rot) mit dem GFP-Kanal (grün) zeigt, dass innerhalb der *klu*-exprimierenden Zellklone eine große Anzahl der Zellen das SOP-Schicksal angenommen hat. (Fortsetzung auf folgender Seite)

(D-G) Expression von UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> in Zellklonen. (D) Nachweis der gebildeten SOPs durch A101. (E) Durch Überlagerung des Hnt- (rot) mit dem GFP-Kanal (grün) wird deutlich, dass sich die meisten Zellen der Klone zu SOPs entwickelt haben. (F, G) Vergrößerung eines Klons, der sich unterhalb der dorso/ventralen Grenze befindet (in D, E nicht zu sehen). Nahezu alle Zellen dieses besonders großen Klons exprimieren A101, haben sich also zu SOPs entwickelt. (G-J) Expression von UAS-*sc* in Zellklonen. (G) Ektopische Hnt-positive Zellen bilden sich auch bei der klonalen Überexpression von UAS-*sc*, jedoch deutlich weniger als in (A) oder (D). (H) Die Überlagerung von Hnt- (rot) und GFP-Kanal (grün) zeigt, dass sich im Vergleich zur klonalen Überexpression von UAS-*klu* (A-C) oder UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> (D-G) nur sehr wenige Zellen innerhalb der Klone zu SOPs entwickelt haben. (I, J) Dies bestätigt auch die Vergrößerung eines Klons aus dem Notum der in (G, H) gezeigten Flügelimaginalscheibe. Der Balken in (A, D, G) entspricht 50µm, in (E) 30µm, in (I) 12,5µm.

qualitativ gleicher Weise agieren und *Klu* demnach genau wie *HA-enKlu*<sup>ΔN</sup> als Repressor wirkt. Allerdings scheint *HA-enKlu*<sup>ΔN</sup> die SOP-Determination noch stärker zu fördern als *Klu*. So entwickelten sich bei der klonalen Überexpressionsstudie von *HA-enKlu*<sup>ΔN</sup> in einigen Fällen alle Zellen eines Klons zu SOPs (s. Ausschnittsvergrößerung, Abb. 23 F und G). Ein derartiger Phänotyp ist bisher noch nicht beschrieben worden und deutet auf eine erhebliche Störung der lateralen Inhibition innerhalb der Klone durch die Expression dieses Konstrukts hin. Um die Bedeutung dieses Phänotyps besser interpretieren zu können, wurde die klonale Überexpressionsstudie mit dem proneuralen Gen *sc* wiederholt. Die Überexpression von UAS-*sc* führte zwar ebenfalls zu Bildung von ektopischen SOPs (Abb. 23 H-K), jedoch konnte in keiner der untersuchten Scheiben eine derart massive Transformation von ektodermalen Vorläuferzellen in SOPs beobachtet werden. Das *HA-enKlu*<sup>ΔN</sup> besitzt folglich ein sehr hohes SOP-förderndes Potential, dass selbst durch die gezielte Überexpression der proneuralen Gene nicht erreicht werden kann. Zusammenfassend haben die Ergebnisse der Struktur-Funktionsanalyse gezeigt, dass *Klu* ein Faktor ist, der als Repressor für die Determination der SOPs benötigt wird und der gleichzeitig über den N-Terminus mit anderen Proteinen interagiert.

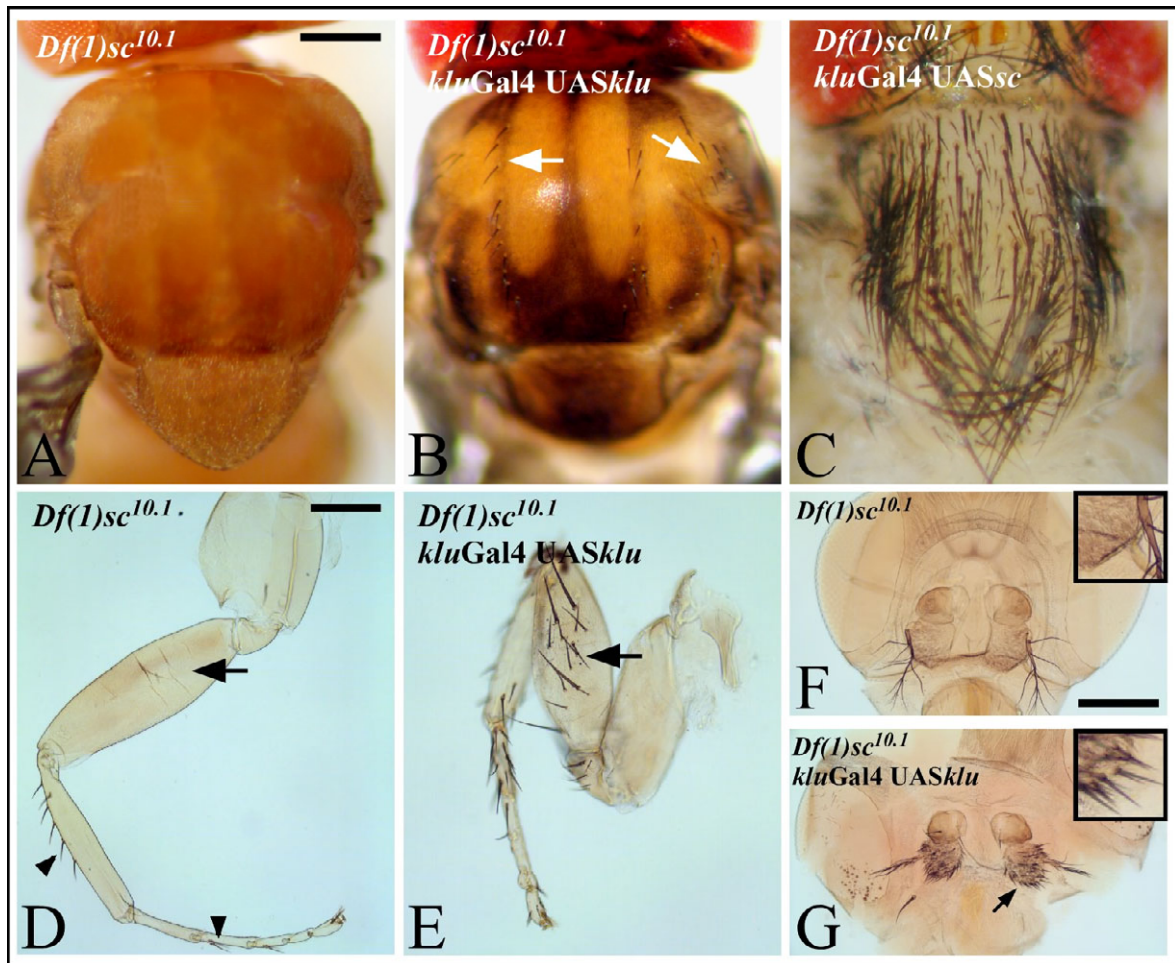
### 2.3 Analyse der funktionellen Beziehung von *klu* und den proneuralen Genen

Die Ergebnisse der Überexpressionsanalyse haben gezeigt, dass *Klu* ein Faktor ist, der für die Determination der SOPs benötigt wird. Eine Erhöhung der *Klu*-Aktivität führt zu mehr SOPs und dementsprechend zu mehr Borsten. Ein sehr ähnlicher Phänotyp entsteht bei einer Überexpression der proneuralen Gene *ac* und *sc* (Abb. 5 I, J) (Rodriguez et al., 1990). Es stellte sich daher die Frage, welche funktionelle Beziehung *klu* zu den beiden proneuralen Genen hat. *klu* könnte ein eigenständiges, neuartiges proneurales Gen sein, welches unabhängig von den anderen die Borstenbildung regulieren kann. Dies ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da sich *Klu* strukturell deutlich von den anderen proneuralen Faktoren unterscheidet und im Gegensatz zu ihnen eine Zink-Finger-Domäne und keine

bHLH-Domäne besitzt. Wahrscheinlicher ist es, dass *klu* selbst kein proneurales Gen ist, jedoch die Aktivität der proneuralen Gene reguliert. *klu* wäre in diesem Fall von den proneuralen Genen abhängig und könnte nur mit ihnen gemeinsam die Borstenbildung induzieren.

### 2.3.1 Überexpression von *klu* in *ac/sc*-Doppelmutanten (*Df(1)sc<sup>10.1</sup>*)

Um zwischen beiden möglichen Erklärungsansätzen unterscheiden zu können, wurde im folgenden Experiment getestet, ob die Überexpression von *klu* die Borstenbildung auch ohne *ac* und *sc* induzieren kann. Dazu wurde UAS-*klu* mit *kluGal4* in Fliegen exprimiert die hemizygot für die Defizienz *Df(1)sc<sup>10.1</sup>* waren. Diesen Tieren fehlt die Funktion der Gene *ac* und *sc*. Sie bilden dementsprechend keine Borsten im Bereich des Thorax' und des Kopfes (Abb. 24 A und Daten nicht gezeigt) aus. In anderen Regionen des Körpers (z.B. den Beinen) entstehen jedoch trotz des Ausfalls von *ac* und *sc* vereinzelt Borsten (s.u.) (Pfeilköpfe in Abb. 24 D). Da die proneuralen Gene untereinander weitgehend redundant sind, kann der Verlust von *ac* z.B. durch die Expression von *sc* ersetzt werden. Dementsprechend ist es möglich, den *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Phänotyp durch die Expression von UAS-*sc* mit *kluGal4* zu retten. Wie in Abb. 24 C gezeigt, führte dies sogar zur Bildung von überzähligen und ektopischen Borsten. Falls *klu* ein proneurales Gen wäre, sollte bei seiner Expression mit *kluGal4* eine ähnliche Rettung des Borstenphänotyps zu beobachten sein. Die Expression von UAS-*klu* führte jedoch nur zur Bildung einzelner kleinerer Borsten auf dem Thorax (Abb 24 B), während andere Bereiche des Körpers, wie z.B. der Kopf, überhaupt keine Borsten ausbildeten (Daten nicht gezeigt). Dieser Phänotyp war ein Nachweis dafür, dass Klu die Aktivität von Sc funktional nicht ersetzen kann und dass Klu von funktionalen proneuralen Genen abhängig ist. Es muss daher angenommen werden, dass *klu* selbst kein proneurales Gen ist. Allerdings ist das Ergebnis nicht eindeutig. Wie bereits erwähnt, führte die Expression von UAS-*klu* zur Bildung einzelner kleinerer Borsten auf dem Thorax (Pfeile in Abb. 24 B). Auch an den Beinen wurden bei einer Überexpression von Klu deutlich mehr Borsten gebildet (Abb. 24 E). Es stellt sich daher die Frage, wie Klu die Bildung dieser Borsten in den *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren induzieren kann, wenn seine Aktivität von den proneuralen Genen *ac* und *sc* abhängig ist. Da in *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren trotz des Fehlens von *ac* und *sc* noch vereinzelt Borsten an den Beinen gebildet werden (Pfeilköpfe in Abb. 24 D), scheint auch bei Abwesenheit von *ac* und *sc* noch eine geringe proneurale Aktivität vorhanden zu sein, die vermutlich durch andere Gene kodiert wird. Diese proneurale „Restaktivität“ könnte durch eine höhere Expression von *klu* derart verstärkt werden, dass sie ausreicht, um die Bildung von zusätzlichen Borsten zu induzieren. Dies würde aber voraussetzen, dass Klu außer mit *ac* und *sc* auch mit anderen proneuralen Genen interagieren kann. Für diese Annahme, spricht die



**Abb. 24: Überexpression von *klu* in *ac/sc*-Doppelmutanten ( $Df(1)sc^{10.1}$ )**

Die Induktion von Borsten durch *klu* ist stark von der Aktivität der proneuralen Gene *ac* und *sc* abhängig. (A, D, F) Das Borstenmuster einer  $Df(1)sc^{10.1}$ -Fliege, der die Gene *ac* und *sc* fehlen. (A) Die  $Df(1)sc^{10.1}$ -Tiere besitzen keine Borsten auf dem Notum. (D) An den Beinen bilden sich trotz des Verlusts von *ac* und *sc* noch vereinzelt Borsten (Pfeilköpfe). Dies zeigt, dass noch eine geringe proneurale Restaktivität in den Beinen vorhanden sein muss. (F) Im dritten Segment der Antenne fehlen keine Sinnesorgane. Hier werden die Geruchssensillen unter Kontrolle der proneuralen Gene *amos* und *atonal* gebildet. (B) Die Expression von UAS-*sc* unter Kontrolle von *kluGal4* führt zur Bildung vieler Borsten in  $Df(1)sc^{10.1}$ -Tieren. (C, E, G) Die Expression von UAS-*klu* unter Kontrolle von *kluGal4* in  $Df(1)sc^{10.1}$ -Tieren. Im Vergleich zu UAS-*sc* führt die Überexpression von UAS-*klu* nur zur Bildung weniger Microchaeten auf dem Notum (Pfeile). Dies zeigt, dass *Klu* größtenteils von der Aktivität von *Ac* und *Sc* abhängig ist. (E) Die in den Beinen vorhandene proneurale Restaktivität wird durch UAS-*klu* vermutlich verstärkt und es bilden sich deutlich mehr Borsten (Pfeil). (G) Im dritten Segment der Antenne ist der normale *klu*-Überexpressionsphänotyp zu beobachten (Pfeil). Es bilden sich zahlreiche ektopische Borsten (s. Ausschnittsvergrößerung). Dies zeigt, dass *Klu* außer mit *ac* und *sc* möglicherweise auch mit anderen proneuralen Genen interagieren kann.

Der Balken in (A, D, F) entspricht 200µm.

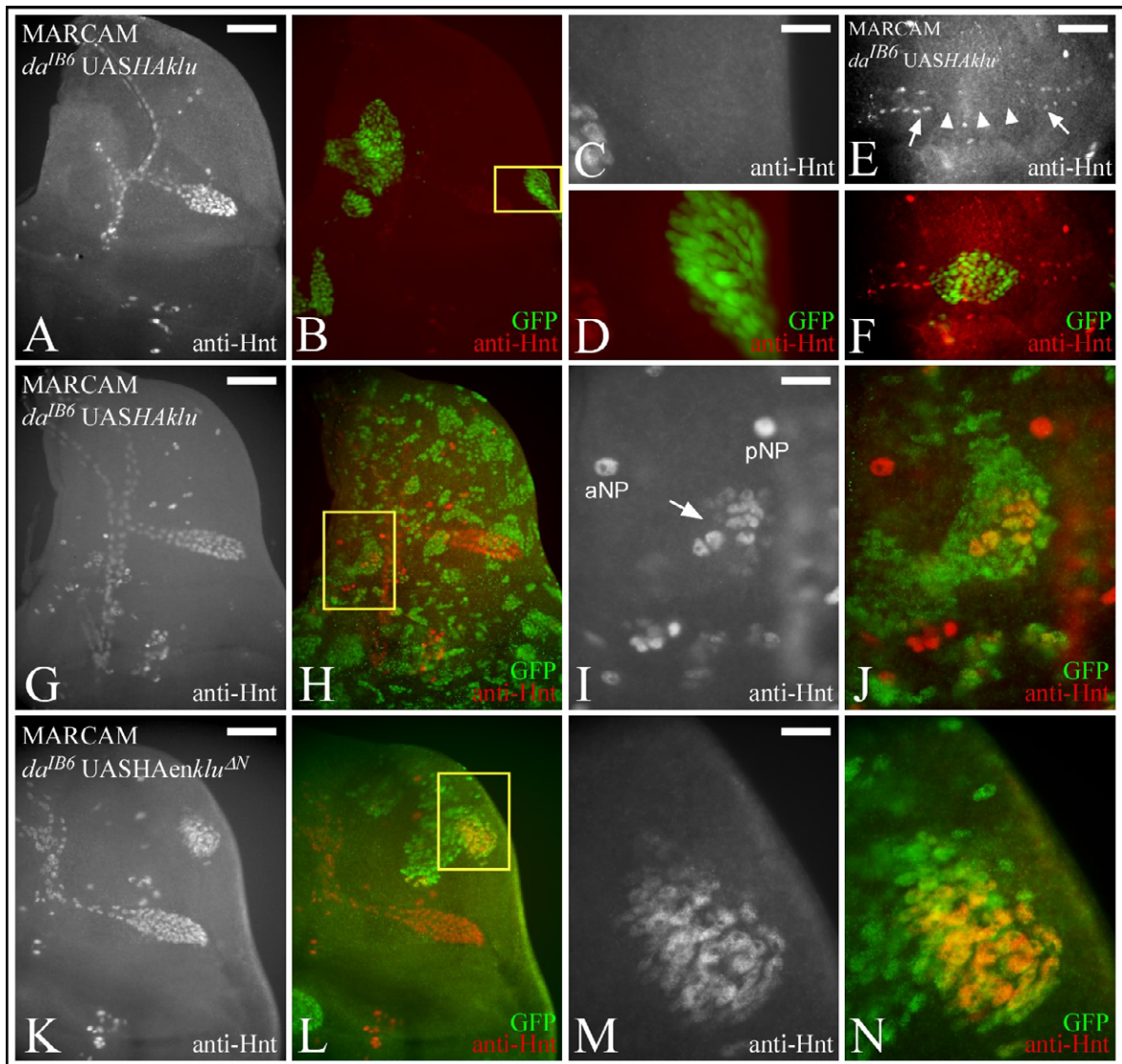
Beobachtung, dass es bei der Expression von UAS-*klu* in  $Df(1)sc^{10.1}$ -Tieren zur Ausbildung ektopischer Borsten im dritten antennalen Segment und damit zu einem identischen Phänotyp wie bei einer Überexpression im Wildtyp (Ausschnitt in Abb. 24 G vgl. mit Abb. 5 H) kommt. Da in diesem Segment nur die beiden proneuralen Gene *amos* und *atonal* aktiv sind, ist zu vermuten, dass *klu* außer mit *ac* und *sc* ebenfalls mit *amos* und/oder *atonal* interagieren kann.

### 2.3.2 Überexpression von *klu* in *da*-mutanten Klonen

Allerdings ist bisher weiterhin nicht geklärt, ob die in den in *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren beobachtete Restaktivität tatsächlich auf einer Interaktion von Klu mit weiteren proneuralen Genen beruht oder ob Klu vielleicht doch in der Lage ist, die Bildung einzelner Borsten unabhängig von den proneuralen Genen zu induzieren.

Um diese Frage abschließend zu klären, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob die Überexpression von *klu* auch dann noch die Borstenbildung induzieren kann, wenn sämtliche proneurale Aktivität fehlt. Dazu wurden mit Hilfe der MARCM-Technik (s. Abschnitt 4.7.14) Zellklone induziert, die *klu* überexprimierten und denen gleichzeitig die Funktion des proneuralen Co-Faktors *da* fehlte. Da angenommen wird, dass *da* als Dimerisierungspartner für die Aktivität aller proneuralen Gene benötigt wird (Cabrera und Alonso, 1991; Van Doren et al., 1991), sollte ein Ausfall der *da*-Funktion den Verlust sämtlicher proneuraler Aktivität in den Klonen bewirken. Die Klone wurden dahingehend analysiert, ob trotz des Ausfalls der proneuralen Aktivität durch eine Überexpression von *klu* die Bildung ektopischer SOPs induziert werden kann oder nicht. Dazu wurden 48-72 Std. alte Klone in Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums untersucht und zum Nachweis der SOPs mit einem Antikörper gegen den SOP-Marker Hnt angefärbt. Die Klone waren positiv durch die Expression von GFP markiert. Das Experiment wurde sowohl mit *UAS-HA-klu* als auch mit dem im Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Repressorfusionsprotein *UAS-HA-enklu<sup>ΔN</sup>* durchgeführt.

Im Gegensatz zu der klonalen Überexpression in einem wildtypischen Hintergrund konnte bei diesem Experiment in dem überwiegenden Teil der *da*-Klone keine SOP-spezifische Färbung nachgewiesen werden (Abb. 25 A-D). Vielmehr wurde durch die Induktion der Klone die Bildung der wildtypischen SOPs verhindert. Abb. 25 F zeigt einen Klon der sich in der Mitte der dorso-ventralen Grenze des Flügelrands befindet. Links und rechts des Klons sind deutlich die zwei parallelen Reihen von Hnt-positiven Zellen zu erkennen (Pfeile in Abb. 25 E), die im Bereich des Klons unterbrochen sind. Der Ausfall von *da* führte hier also zum Verlust der entsprechenden Vorläuferzellen. Im starken Gegensatz dazu konnten aber auch einige Klone gefunden werden in denen ektopische SOPs gebildet wurden. In Abb. 25 G, H ist eine entsprechende Imaginalscheibe dargestellt, in der HA-Klu in den *da*-Klonen überexprimiert wurde. Obwohl auch hier in den meisten Klonen keine SOPs gebildet werden, gibt es einen Klon in dem mehrere Zellen eine ektopische Hnt-Färbung zeigen. Der Bereich, in dem sich der Klon befindet, ist in der Imaginalscheibe gelb umrahmt. Dieser Ausschnitt ist in der Abb. 25 I, J nochmals vergrößert dargestellt. In dieser Vergrößerung sind neben den in dieser Region der



**Abb. 25: Überexpression von UAS-*klu* und UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> in *da*-mutanten Klonen**

Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen mit Hilfe der MARCM-Technik Zellklone induziert wurden, die mutant für die Genfunktion von *da* waren und gleichzeitig entweder UAS-*klu* (A-J), oder UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> (K-N) überexprimierten. Die Klone wurden im ersten Larvenstadium induziert und 72-96 Std. später analysiert. Sie sind durch Co-Expression von GFP markiert (grüne Färbung). Der Nachweis der SOPs erfolgte durch eine Antikörperfärbung gegen Hnt. (A-D) Der Verlust von *da* verhindert in den meisten Klonen, dass sich trotz der Überexpression von UAS-*klu* SOPs bilden. In (C,D) ist exemplarisch ein Klon vergrößert gezeigt. (E, F) Ein Zellklon im Bereich des vorderen Flügelrands, wo die SOPs der innervierten Borsten gebildet werden (Pfeile). Im Bereich des Zellklons bilden sich keine SOPs (Pfeilköpfe). (J-M) Trotz des Verlustes von *da*, bilden sich bei der Überexpression von *klu* ektopische SOPs. Ein derartiger Klon ist in (H) durch einen Rahmen markiert. (I, J) Ausschnittsvergrößerung aus (H). Der Pfeil in (I) zeigt eine Gruppe Hnt-exprimierender Zellen. (J) Die Hnt-exprimierenden Zellen liegen innerhalb des *da*-mutanten Klons. (K-N) Die Überexpression von UAS-*HA-enklu*<sup>ΔN</sup> führt in einzelnen Fällen zur Bildung ektopischer SOPs in *da*-mutanten Klonen. Ein entsprechender Klon ist in (M, N) vergrößert dargestellt.

Der Balken in (A, G, K) entspricht 50µm, in (E) 30µm, in (C, I, M) 12,5µm.

Imaginalscheibe natürlich vorkommenden SOPs der aNP und pNP Borsten deutlich eine Anhäufung von Hnt-positiven Zellen zu erkennen (in Abb. 25 I durch einen Pfeil markiert). Die Überlagerung mit dem GFP-Kanal zeigt, dass sich diese Zellen inmitten eines *da*-

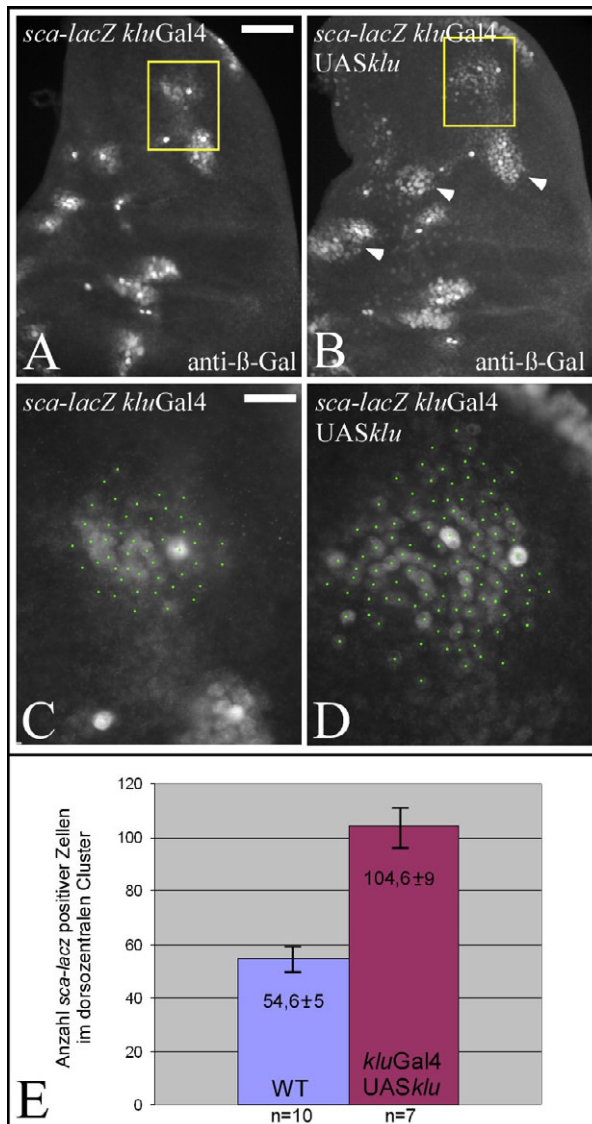


Klons befinden, während die aNP und pNP Vorläufer keine GFP-Färbung aufweisen (Abb. 25 J). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde auch bei der Überexpression von HA-enKlu<sup>ΔN</sup> gefunden. Obwohl auch hier die meisten Klone keine Hnt-Färbung zeigten, konnten stets einige Klone gefunden werden, in denen Hnt-positive Zellen zu erkennen waren. Abb. 25 K, L zeigt eine entsprechende Imaginalscheibe. Der Bereich des Klons ist in Abb. 25 M, N vergrößert abgebildet. Es ist festzustellen, dass trotz des Ausfalls jeglicher proneuraler Aktivität die Überexpression von HA-enKlu<sup>ΔN</sup> ausreicht, damit sich zahlreiche Zellen zu SOPs differenzieren. Im Vergleich zu HA-Klu war die Anzahl der Hnt-positiven Klone bei HA-enKlu<sup>ΔN</sup> deutlich höher, ebenso wie die Anzahl der gebildeten SOPs pro Klon. Dieses Ergebnis bekräftigt somit die bisherigen Schlussfolgerungen, dass beide Konstrukte in ihrer Funktionsweise qualitativ gleich sind, HA-enKlu<sup>ΔN</sup> aber ein höheres Potential besitzt, die SOP Bildung zu induzieren (vgl. mit Abschnitt 2.2.3).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die MARCM Analyse die Ergebnisse der vorausgegangenen *Df(1)sc<sup>10.1</sup>* Experimente bestätigt wurden: Die Fähigkeit von *klu*, bei einer Überexpression ektopische SOPs bzw. Borsten zu erzeugen, ist stark von der Gegenwart proneuraler Aktivität abhängig, diese Abhängigkeit scheint aber nicht absolut zu sein.

### 2.3.3 Die Überexpression von *klu* fördert die proneurale Aktivität

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass *klu* vermutlich kein proneurales Gen ist und seine Aktivität von der Gegenwart der proneuralen Gene abhängig ist. Es bleibt dennoch die Frage zu klären, wie Klu die Determination der SOPs reguliert und bei Überexpression ektopische Borsten induzieren kann. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass Klu die Aktivität der proneuralen Gene reguliert. Um dies zu testen, wurde zunächst die Expression eines bekannten Zielgens von Ac und Sc, *scabrous (sca)*, in *klu*-überexprimierenden Zellen untersucht. Da *sca* in gleicher Weise wie die beiden proneuralen Gene exprimiert wird, kann es zum Nachweis proneuraler Aktivität herangezogen werden. Analysiert wurde die Expression eines *sca-lacZ* Reporterkonstrukts in Flügel-imaginalscheiben des dritten Larvenstadiums. Die unter der Kontrolle des *sca*-Promotors erfolgte Expression der  $\beta$ -Galaktosidase wurde mit einem anti- $\beta$ -Galaktosidase (anti- $\beta$ -Gal) Antikörper nachgewiesen. Parallel dazu wurde eine Antikörperfärbung gegen den SOP-Marker Hnt durchgeführt und die mit *kluGal4* aktivierte Expression von *klu* durch ein UAS-*GFP* Marker dokumentiert. Durch den Vergleich mit der *sca-lacZ* Expression in einer ansonsten wildtypischen Scheibe zeigte sich, dass sich bei einer Überexpression von *klu* die Expressiondomänen von *sca-lacZ* deutlich verbreiterten (Pfeilköpfe in Abb. 26 B vgl. mit A). Zudem war die Anzahl der Zellen, die eine sehr starke *sca-lacZ* Expression zeigen, erhöht.



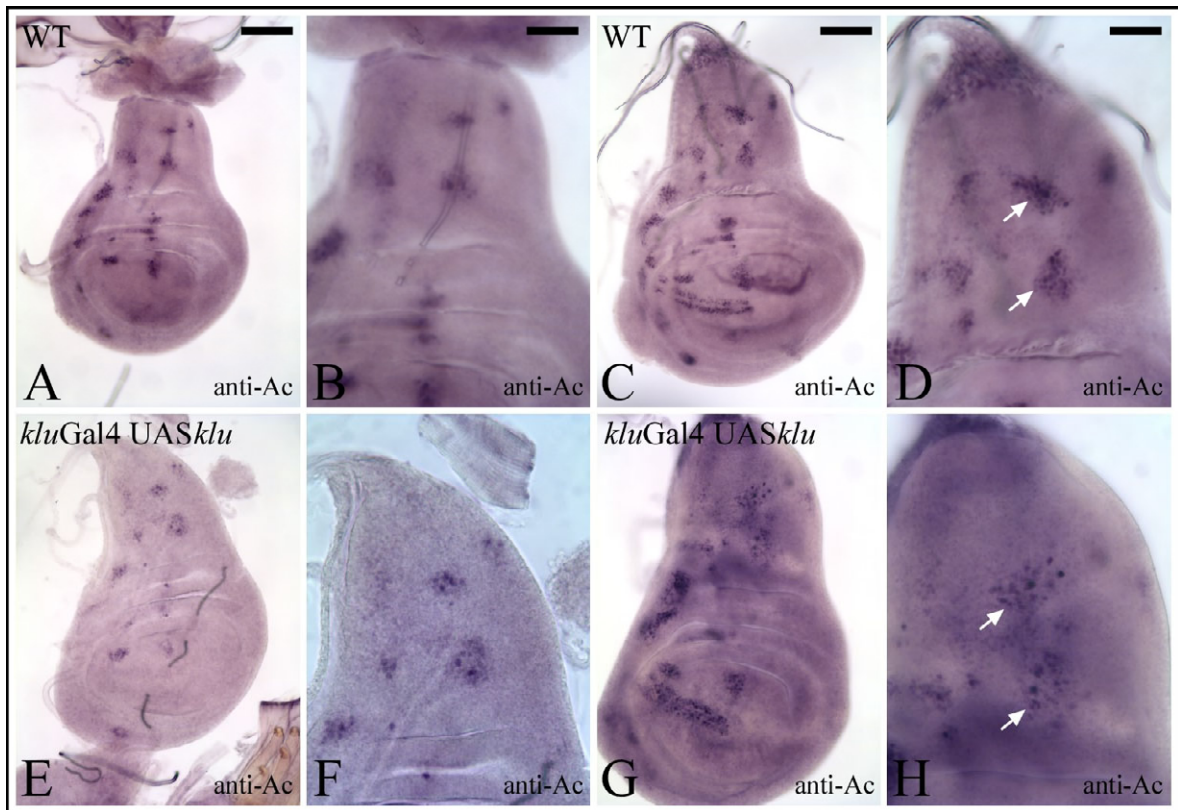
**Abb. 26: Die Überexpression von *klu* führt zu einer verstärkten Expression von *sca-lacZ***

(A-D) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums (A) Expression eines *sca-lacZ* Reporterkonstrukts. Die unter der Kontrolle des *sca*-Promotors erfolgte Expression der β-Galaktosidase reflektiert das normale *sca*-Expressionsmuster und wurde mit einem anti-β-Galaktosidase (anti-β-Gal)-Antikörper nachgewiesen. Als direktes Zielgen von *ac* und *sc* wird *sca* in allen proneuralen Clustern exprimiert. (B) Die Überexpression von UAS-*klu* aktiviert durch *kluGal4* führt zu einer Verbreiterung der *sca-LacZ*-Expressionsdomänen (Pfeilköpfe). (C-E) Vergleich der Anzahl *sca-lacZ*-exprimierender Zellen im Bereich des dorsozentralen Clusters in wildtypischen und *klu*-überexprimierenden Scheiben. Der relevante Bereich ist in (A, B) durch einen Rahmen markiert und in (C, D) vergrößert dargestellt. Zellen, die in der Auswertung berücksichtigt wurden sind durch einen grünen Punkt markiert. (E) Grafische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der *sca-lacZ*-exprimierenden Zellen im dorsozentralen Cluster von wildtypischen (blauer Balken) und *klu*-überexprimierenden (roter Balken) Zellen. Im Vergleich zum Wildtyp ( $54,6 \pm 5$ ) hat sich bei der Expression von UAS-*klu* ( $104,6 \pm 9$ ) die Zahl der *sca-lacZ*-exprimierenden Zellen fast verdoppelt. Der Balken in (A) entspricht  $50 \mu\text{m}$ , in (C)  $12,5 \mu\text{m}$ .

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde in einer weiteren Analyse die Anzahl der gebildeten *sca-lacZ* positiven Zellen in einer definierten Expressionsdomäne miteinander verglichen. Dazu wurden in mehreren *klu*-überexprimierenden Imaginalscheiben die *sca-lacZ* positiven Zellen im Bereich des dorsozentralen Clusters gezählt und mit der Anzahl im Wildtyp verglichen (Abb. 26 C-E). Bei diesem Vergleich stellte sich heraus, dass sich bei einer Überexpression von *klu* die Zahl der *sca-lacZ* positiven Zellen fast verdoppelt hat ( $104,6 \pm 9$  ( $n=7$ ) zu  $54,6 \pm 5$  ( $n=10$ )).

### 2.3.4 Auswirkung der *klu*-Überexpression auf die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc*

Die beobachtete Erhöhung der *sca-lacZ*-Expression kann auf zwei Weisen erklärt werden: *Klu* könnte entweder direkt die Expression der proneuralen Gene regulieren oder es könnte nur die Aktivität von *Ac* und *Sc* erhöhen, indem es die Fähigkeit der beiden Faktoren steigert, ihre Zielgene zu aktivieren bzw. die Sensitivität der Zellen gegenüber der gegebenen proneuralen Aktivität erhöht.



**Abb. 27: Die Überexpression von *klu* hat keinen Einfluss auf die Expression von Ac**

Die Expression von Ac in wildtypischen (A-D) und *klu*-überexprimierenden (E-H) Flügelimaginalscheiben. Die Ac-Expression wurde durch einen Antikörperfärbung gegen Ac nachgewiesen.

(A, B, E, F) Scheiben in der mittleren Phase des dritten Larvenstadiums. Wie der Vergleich mit dem Wildtyp (A, B) zeigt, wird die Expression von Ac in *klu*-überexprimierenden Imaginalscheiben (E, F) normal initiiert. Ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp ist nicht zu erkennen. (C, D, G, H) Scheiben des späten dritten Larvenstadiums. Im Vergleich zu Wildtyp wird die Ac-Expression in den proneuralen Clustern der *klu*-überexprimierenden Imaginalscheibe diffuser und viele Zellen stoppen die Expression von Ac frühzeitig (vgl. mit Pfeilen markierte Bereiche in D und H). Eine Verbreiterung der Ac-Expressionsdomänen oder eine ektopische Aktivierung der Ac-Expression kann nicht festgestellt werden. Folglich scheint Klu keinen direkten Einfluss auf die Expression von Ac auszuüben.

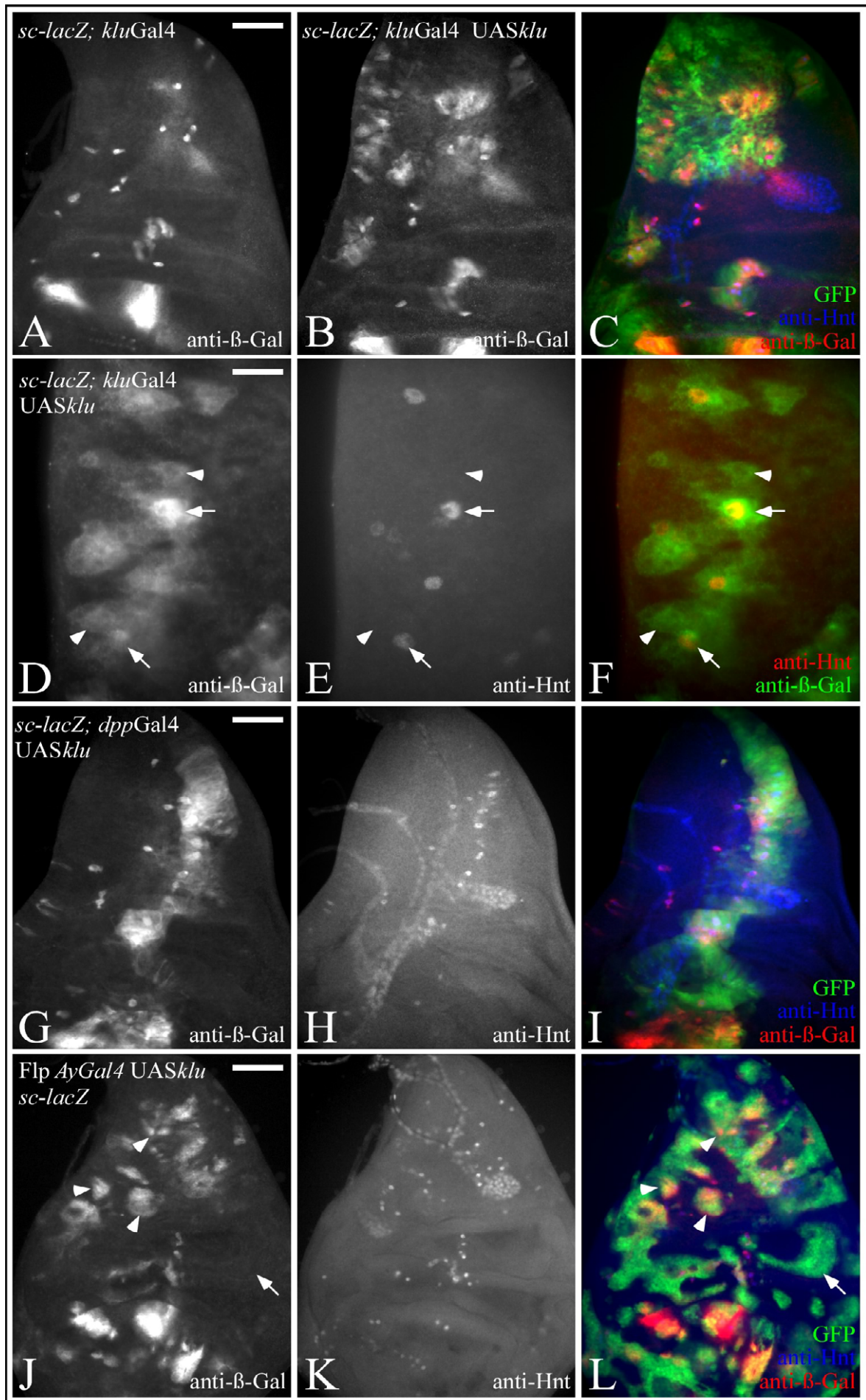
Der Balken in (A, C) entspricht 25µm, in (B, D) 50µm.

Um zu testen, ob Klu einen direkten Einfluss auf die Expression der proneuralen Gene hat, wurde mittels einer Antikörperfärbung die Expression von Ac in *klu*-überexprimierenden (Abb. 27 E-H) und wildtypischen (Abb. 27 A-D) Flügelimaginalscheiben verglichen. Wie bei einem Vergleich der Abbildungen zu erkennen ist, konnte bei der Überexpression von *klu* keine qualitative Änderung der Expression von Ac festgestellt werden. Die Cluster wurden alle normal angelegt und waren in ihrer Größe nicht verändert. In Imaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums waren die Cluster im Vergleich zum Wildtyp jedoch diffuser und viele Zellen des Clusters stellten die Ac-Expression ein (vgl. die durch Pfeile markierte Cluster in Abb. 27 D und H). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei einer Überexpression von *klu* die SOPs früher determiniert werden und dass in dem Cluster mehr SOPs gebildet werden. Da aber die SOPs nach ihrer Determination die

Expression von *Ac* und *Sc* in ihren Nachbarzellen unterdrücken, führt dies vermutlich zu dem diffusen Erscheinungsbild der Cluster.

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die Überexpression von *klu* keinen direkten Einfluss auf die Expression von *ac* hat. Demnach wäre auch die breitere Aktivierung der Zielgene der proneuralen Gene nicht auf eine Erhöhung ihrer Expression zurückzuführen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde in einem Experiment die Auswirkung der *klu*-Überexpression auf die Expression von *sc* untersucht. Da bei der Durchführung der Experimente kein funktionaler anti-*Sc*-Antikörper zur Verfügung stand, wurden die Untersuchungen mit Hilfe verschiedener Promotor/Enhancer-*lacZ*-Konstrukte durchgeführt. Zunächst wurde die Expression eines 3,7 kb großen Fragments des *sc*-Promotors untersucht. Dieses Promotorfragment aktiviert die Expression des *lacZ*-Reportergens in verschiedenen Bereichen der Flügelimaginalscheibe (Gomez-Skarmeta et al., 1995). Eine entsprechende Scheibe ist in Abb. 28 A gezeigt. Es ist eine starke Expression in zwei größeren Bereichen im dorsalen Teil der Flügeltasche zu erkennen. Diese Bereiche entsprechen den Expressionsdomänen der beiden proneuralen Cluster TSM und L3 (vgl. auch mit Abb. 3 B). Im Notum erfolgt die Expression hauptsächlich in den sich entwickelnden SOPs. Das Konstrukt enthält demnach den für eine Expression in den SOPs relevanten SOP Enhancer, dessen Aktivität, wie frühere Experimente bereits gezeigt haben, von der Gegenwart von *ac* und *sc* abhängig ist (Gomez-Skarmeta et al., 1995). Zusätzlich zu der Expression in den SOPs ist auch eine schwache Expression in den Nachbarzellen der SOPs zu erkennen. Das Promotorfragment scheint folglich noch ein weiteres Enhancerelement zu enthalten, das, wenn auch relativ schwach, eine allgemeine Expression von *sc* in den proneuralen Clustern fördert.

Um die Auswirkungen der Überexpression von *klu* auf die Expression des 3,7 kb großen Reporterkonstrukts zu untersuchen, wurde in *klu* überexprimierenden Imaginalscheiben die Expression von *sc-lacZ* mit einem anti- $\beta$ -Gal Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine anti-Hnt Antikörperfärbung durchgeführt und die Expression von *klu* durch ein UAS-*GFP* Marker dokumentiert. Es zeigte sich, dass bei einer Überexpression von *klu* mit *kluGal4* eine starke, zum Teil auch ektopische Aktivierung des Reporterkonstrukts erfolgte (Abb. 28 B, C). Insbesondere in Bereichen, in denen sich ektopische SOPs bildeten, ist eine starke Expression von *sc-lacZ* zu beobachten. Diese ektopische *sc-lacZ* Expression ist jedoch nicht auf die SOPs beschränkt, sondern kann auch in angrenzenden Zellen nachgewiesen werden. In Abb. 28 D-F ist der vergrößerte Bereich des anterioren Notums gezeigt. Die Überlagerung beider Kanäle verdeutlicht (Abb. 28 F), dass die Expression des Reporterkonstrukts sowohl in den hnt-positiven SOPs (Pfeile) als auch in benachbarten Zellen, die keine Hnt-Färbung zeigen (Pfeilköpfe), nachzuweisen ist. Allerdings wird das Reporterkonstrukt nicht in allen *klu*-überexprimierenden Zellen aktiviert. Dies



**Abb. 28: Einfluss der Überexpression von *klu* auf die Aktivität des *sc-lacZ*-Reporters**

(A-I) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen die Aktivität eines 3,7 kb großen Fragments des *sc*-Promotors mit Hilfe eines *lacZ*-Reporterkonstrukts (*sc-lacZ*) analysiert wurde. Die Expression von *sc-lacZ* wurde durch eine anti- $\beta$ -Gal-, die SOPs durch eine anti-Hnt-Antikörperfärbung nachgewiesen. (A) Expression von *sc-lacZ* in einer sonst wildtypischen Imaginalscheibe. Das *sc*-Promotorfragment aktiviert die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in zwei proneuralen Clustern (TSM, L3) im dorsalen Teil der Flügeltasche, sowie in den SOPs. Das Konstrukt enthält demnach, den für die Expression in SOPs relevanten SOP-Enhancer. Im Notum ist eine schwache Expression auch in den Nachbarzellen der SOPs zu erkennen. (B-F) Die Expression von UAS-*klu* aktiviert durch *kluGal4* führt zu einer Aktivierung des Reporters. Besonders im anterioren Bereich des Notums, in dem zahlreiche ektopische SOPs gebildet wurden, ist eine starke Expression von *sc-lacZ* zu beobachten. Dieser Bereich ist in (D-F) vergrößert gezeigt. Die Überlagerung von anti- $\beta$ -Gal- (grün) und anti-Hnt-Kanal (rot) zeigt (F), dass die Expression von *sc-lacZ* nicht nur in den SOPs (Pfeile), sondern auch in dazu benachbarten Zellen (Pfeilköpfe) durch *klu* ektopisch aktiviert wird. (G-I) Eine ektopische Aktivierung der *sc-lacZ*-Expression zeigt sich auch bei der Überexpression von UAS-*klu* mit der Aktivatorlinie *dppGal4*. (J-K) Überexpression von UAS-*klu* in Klonen, die durch eine Kombination des UAS/Gal4-Systems und Flp/FRT vermittelter Rekombination induziert wurden. Die klonale Überexpression von *klu* führt ebenfalls zu einer ektopischen Aktivierung des *sc-lacZ*-Reporters. (L) Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass in vielen Klonen (grün) die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (rot) aktiviert wird (Pfeilköpfe). Es gibt aber auch Bereiche, in denen die klonale Überexpression von *klu* nicht zu einer Aktivierung des *sc-lacZ*-Reporters führt (Pfeil). Der Balken in (A, G, J) entspricht 50 $\mu$ m, in (D) 12,5 $\mu$ m.

deutet darauf hin, dass noch weitere Faktoren für die Aktivierung von *sc-lacZ* benötigt werden.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Überexpressionsstudien, in denen Antikörperfärbungen gegen das Ac Protein durchgeführt wurden, lassen diese Daten vermuten, dass eine Überexpression von *klu* doch einen Einfluss auf die generelle Expression von *sc* haben könnte. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde das Experiment mit einer anderen Aktivatorlinie (*dppGal4*) wiederholt. *dppGal4* aktiviert im Notum die Expression in einem breiten Streifen im posterioren Bereich der Imaginalscheibe (grüne GFP-Färbung in Abb. 28 I). Wird UAS-*klu* mit *dppGal4* aktiviert, ist ebenfalls eine starke Expression des *sc-lacZ* Reporters zu beobachten. Insbesondere in den SOPs ist eine deutliche anti- $\beta$ -Gal-Färbung zu erkennen. Wie in dem Experiment zuvor, ist auch hier die Expression des Reporters nicht auf die SOPs beschränkt, sondern kann auch in benachbarten Zellen detektiert werden (Abb. 28 G). Die Überexpression von UAS-*klu* mit *dppGal4* führt somit zu einem qualitativ vergleichbaren Phänotyp wie die Expression mit *kluGal4*. Beide Experimente lassen vermuten, dass eine Über- bzw. ektopische Expression von *klu* sowohl die Expression von *ac/sc* in einzelnen SOPs als auch deren generelle Expression in den proneuralen Clustern ektopisch aktivieren kann.

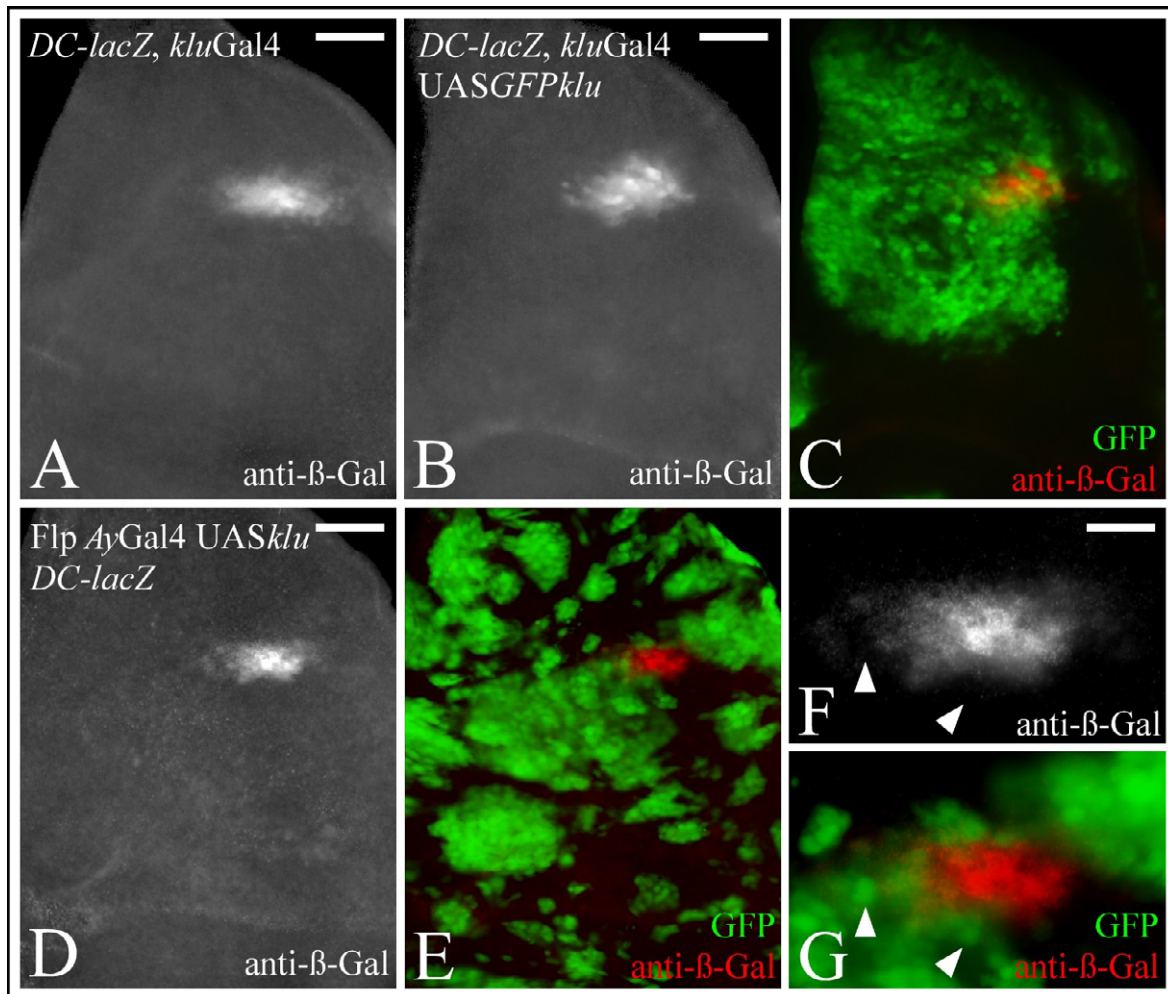
Nochmals bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine klonale Überexpressionsstudie von *klu*. Für diese Studie wurden durch die Kombination der Flp/FRT-Technik mit dem UAS/Gal4-System Zellklone in Flügelimaginalscheiben induziert, die UAS-*klu* exprimierten. Durch die Co-Expression von UAS-GFP waren die Klone positiv markiert und konnten leicht identifiziert werden. Zusätzlich zu den beiden UAS-Konstrukten enthielten die

Scheiben den *sc-lacZ*-Reporter, dessen Expression durch eine anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung nachgewiesen wurde. Wie in Abb. 28 J-L zu sehen ist, sind die induzierten Klone in der Lage, die Expression von *sc-lacZ* ektopisch zu aktivieren. Allerdings erfolgt diese Aktivierung nicht gleichmäßig in allen Klonen, sondern ist auf die Regionen der Scheibe beschränkt, in denen sich die proneuralen Cluster bilden, in denen also auch normalerweise eine Expression von *ac* und *sc* erfolgt. Beispiele für diese Klone sind in Abb. 28 J, L mit einem Pfeilkopf markiert. Im Gegensatz dazu zeigt der durch einen Pfeil markierte Klon, der sich außerhalb der normalen *ac/sc* Expressionsdomänen befindet, keine *sc-lacZ* Expression. Diese Daten lassen vermuten, dass die Aktivierung von *sc-lacZ* durch *Klu* nicht vollkommen unabhängig erfolgt, sondern dass noch weitere Faktoren dafür benötigt werden. Das Ergebnis stimmt folglich mit den Daten überein, die zuvor bei der Überexpression von *klu* mit *kluGal4* erhalten wurden. Die Verteilung der *sc-lacZ* positiven Klone deutet hier allerdings darauf hin, dass sich diese Faktoren innerhalb der proneuralen Cluster befinden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die bisherigen Untersuchungen zu zwei gegensätzlichen Ergebnissen geführt haben. Einerseits scheint die Überexpression von *klu* keinen Einfluss auf die normale Expression von *ac* zu haben. Dieses Ergebnis spricht gegen die Annahme, dass *klu* die generelle Expression der proneuralen Gene direkt reguliert. Andererseits konnte durch die Studien mit dem *sc-lacZ*-Reporter gezeigt werden, dass *Klu* zumindest in bestimmten Regionen der Scheibe die Expression dieses Reporters ektopisch aktivieren kann. Diese Feststellung spricht wiederum dafür, dass *Klu* nicht nur die Aktivität, sondern auch die Expression der proneuralen Gene direkt beeinflusst. Allerdings beinhaltet das verwendete Reporterkonstrukt nicht den gesamten Promoter von *sc*. Solche verkürzten Promoterfragmente spiegeln oft nicht die endogene Expression wider.

Um weitere Klarheit zu erlangen, ob *klu* direkt die Expression von *ac* und *sc* beeinflusst, wurde die Expression eines weiteren Reporterkonstrukts untersucht. Dieser Reporter enthielt ein bereits gut analysiertes Enhancer-Element des *AS-K*, den so genannten dorsozentralen Enhancer (DC-E). Von diesem Enhancer-Element ist bekannt, dass es ausschließlich die allgemeine Expression von *ac* und *sc* im dorsozentralen Cluster aktiviert, jedoch keine Bedeutung für die Expression innerhalb der SOPs besitzt.

Eine Flügelimaginalscheibe, in der die Expression dieses Reporters (*DC-lacZ*) durch eine anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung nachgewiesen wurde, ist in Abb. 29 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression ausschließlich auf den Bereich des dorsozentralen Clusters beschränkt ist. Wurde in Gegenwart dieses Reporterkonstrukts *UAS-klu* mit *kluGal4* überexprimiert, konnte keine offensichtliche Änderung des Expressionsmusters von *DC-lacZ* festgestellt werden. In den untersuchten Imaginalscheiben war weder eine



**Abb. 29: Die Überexpression von *klu* hat keinen Einfluss auf die Aktivität des dorsozentralen Enhancers**

(A-I) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen die Aktivität des dorsozentralen Enhancers durch ein *lacZ*-Reporterkonstrukt (*DC-lacZ*) analysiert wurde. Der dorsozentrale-Enhancer aktiviert normalerweise die allgemeine Expression von *ac* und *sc* im dorsozentralen Cluster. Die Expression von *DC-lacZ* wurde mit einem anti-β-Gal-Antikörper nachgewiesen. (A) Die Expression von *DC-lacZ* in einer sonst wildtypischen Imaginalscheibe. Die Expression des Reporters ist auf die Region des dorsozentralen Clusters beschränkt. (B) Die Expression von UAS-*klu* aktiviert durch *kluGal4* hat keinen Einfluss auf die normale Expression des *DC-lacZ*-Reporters. Es ist weder eine signifikante Vergrößerung der Expressionsdomäne, noch eine ektopische Aktivierung des Reporters zu beobachten. (C) Die *DC-lacZ*-exprimierenden Zellen (rot) liegen innerhalb der *Klu*-Expressionsdomäne (grün). (E-G) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in der UAS-*klu*-überexprimierende Klone durch eine Kombination des UAS/Gal4-Systems und Flp/FRT vermittelter Rekombination induziert wurden. Eine Veränderung des *DC-lacZ*-Expression kann auch bei einer Überexpression von *klu* in Klonen nicht festgestellt werden. Selbst in *klu*-exprimierenden Zellen, die unmittelbar an den Bereich des dorsozentralen Clusters grenzen, wurde der Reporter nicht aktiviert (Pfeilköpfe in der Ausschnittsvergrößerung in F und G).

Der Balken in (A, B, D) entspricht 30µm, in (F) 12,5µm.

signifikante Vergrößerung der Expressionsdomäne im Bereich des dorsozentralen Clusters zu beobachten, noch führte die Überexpression von *klu* zu einer ektopischen Aktivierung des Reporters in anderen Bereichen der Scheibe (Abb. 29 A-C). Ein identisches Ergebnis wurde in einem weiteren Experiment gewonnen, in dem mittels des

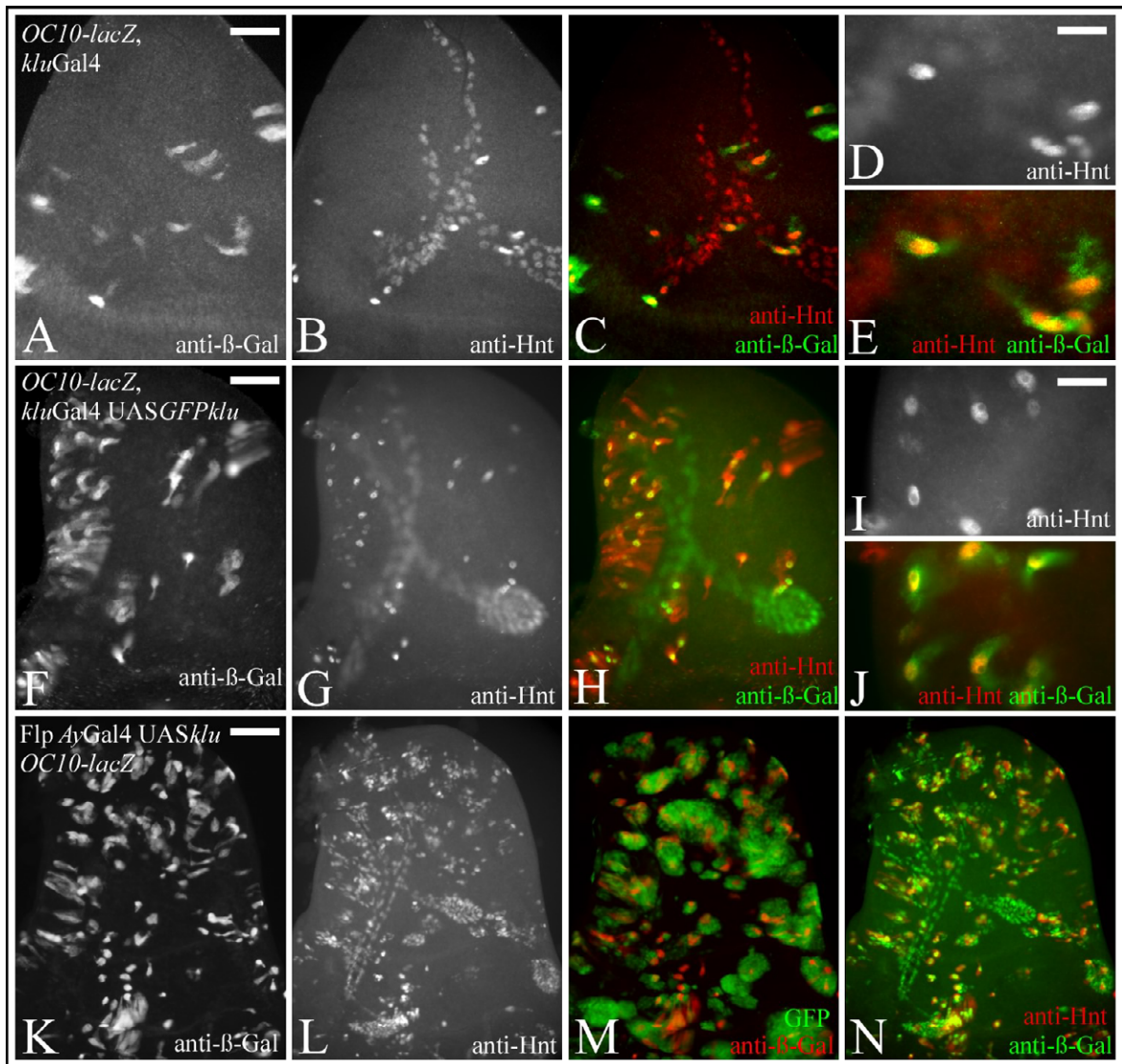


Flp/FRT-Systeme (s.o.) *klu* in Klonen überexprimiert wurde. Dieses System bewirkt eine starke und anhaltende Aktivierung der *klu*-Expression und führt dementsprechend zu einer starken Aktivierung der Zielgene von *Klu*. Doch auch die klonale Expression von *klu* führte nicht zu einer ektopischen Aktivierung des *DC-lacZ* Konstrukts (Abb. 29 D-G). Selbst in *klu*-überexprimierenden Zellen die unmittelbar an den Bereich des dorsozentralen Clusters angrenzen, wurde der Reporter nicht aktiviert (s. Pfeilkopf in der Ausschnittsvergrößerung in Abb. 29 F, G).

### 2.3.5 Die Überexpression von *klu* führt zur Aktivierung des SOP-Enhancers

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass durch eine Überexpression von *klu* die allgemeine Expression von *ac* und *sc* in den proneuralen Clustern nicht beeinflusst wird und bestätigen die Ergebnisse der anti-Ac Antikörperfärbungen (s.o). Es muss daher angenommen werden, dass die zuvor beobachtete Aktivierung des *sc-lacZ*-Reporters nicht auf eine Aktivierung der allgemeinen Expression von *sc* zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich doch auf einer Aktivierung des SOP-spezifischen Enhancers beruht. Der SOP-Enhancer steuert normalerweise die hohe Akkumulation von Ac und Sc in der sich bildenden SOPs. Er wird selbst von Ac und Sc aktiviert und stellt somit ein weiteres Zielgen der proneuralen Gene dar. Um zu testen, ob *Klu* einen Einfluss auf die Aktivität des SOP-Enhancers besitzt, wurde die Expression eines weiteren Reporterkonstrukts (*OC10-lacZ*) analysiert. Bei diesem Reporterkonstrukt handelte es sich um einen künstlichen Minimalenhancer (*OC10*), der alle für eine spezifische Expression in der SOP relevanten Enhancerelemente enthielt (s. Abschnitt 1.3) (Culi und Modolell, 1998). Diese Enhancerelemente waren als Sequenz viermal hintereinander geschaltet und induzieren die Expression des *lacZ*-Reportergens ausschließlich in den SOPs. Das Expressionsmuster von *OC10-lacZ* in einer ansonsten wildtypischen Flügelimaginalscheibe zeigt die Abb. 30 A. Es ist deutlich die auf einzelne Zellen beschränkte Expression des Konstrukts in den Regionen der verschiedenen proneuralen Cluster zu erkennen. Durch eine Überlagerung der anti- $\beta$ -Gal-Färbung mit der Antikörperfärbung gegen den SOP-Marker *Hnt* wird deutlich, dass der SOP-Enhancer die Expression von *OC10-lacZ* ausschließlich in den Zellen aktiviert, in denen auch der SOP-Marker *Hnt* exprimiert wird, die sich also zu SOPs differenzieren (Abb. 30 C, E). Um die Auswirkungen einer Überexpression von *klu* auf die Expression dieses Reporterkonstrukts zu analysieren, wurde ein *klu*-Konstrukt mit *kluGal4* überexprimiert und Imaginalscheiben des dritten Larvenstadiums untersucht. Aus kreuzungstechnischen Gründen wurde in diesem Fall *UAS-GFP-klu* und nicht *UAS-klu* verwendet. Beide Konstrukte haben die gleiche Aktivität und führen bei einer Überexpression zu identischen Phänotypen (s. Abschnitt 2.2).

Bei der Überexpression von *UAS-GFP-klu* kam es zu einer deutlichen ektopischen Aktivierung des SOP-Enhancers in zahlreichen Zellen der Flügelimaginalscheibe. Besonders



**Abb. 30: Die Überexpression von *klu* führt zu einer Aktivierung des künstlichen SOP-Enhancers OC10**

(A-N) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen die Auswirkungen einer Überexpression von UAS-*GFP-klu* auf die Aktivität eines künstlichen SOP-Enhancers (*OC10*) mit Hilfe eines *lacZ*-Reporterkonstrukts (*OC10-lacZ*) analysiert wurde. Die Expression von *OC10-lacZ* wurde durch eine anti- $\beta$ -Gal-, die SOPs durch eine anti-Hnt-Antikörperfärbung nachgewiesen. (A-E) Expression von *OC-lacZ* in einer sonst wildtypischen Imaginalscheibe. (A) Die Expression des Enhancers ist auf einzelne Zellen beschränkt. Die Überlagerung von anti- $\beta$ -Gal- (grün) und anti-Hnt-Kanal (rot) zeigt (C, E), dass die Expression von *OC10-lacZ* nur in den SOPs erfolgt. (F-J) Bei Expression von UAS-*GFP-klu* aktiviert durch *kluGal4* kommt es zu einer ektopischen Aktivierung des Reporters insbesondere im anterioren Bereich des Notums. Durch die Überlagerung von anti- $\beta$ -Gal- (grün) und anti-Hnt-Kanal (rot) wird deutlich (H, J), dass die ektopische Aktivierung von *OC10-lacZ* nur in den Hnt-positiven Zellen und damit in den ektopischen SOPs erfolgt. (I, J) Ausschnittsvergrößerung aus (F, H). Gezeigt ist der Bereich des anterioren Notums, in dem sich viele ektopische SOPs bilden. Die ektopische Aktivierung von *OC10-lacZ* erfolgt nur in diesen Zellen. (K-N) Überexpression von UAS-*GFP-klu* in Klonen, die durch eine Kombination des UAS/*Gal4*-Systems und FLP/*FRT* vermittelter Rekombination induziert wurden. Die klonale Überexpression von UAS-*GFP-klu* führt ebenfalls zu einer ektopischen Aktivierung des *OC10-lacZ*-Reporters innerhalb der Klone (M). Diese Aktivierung ist wie bei der Überexpression mit *kluGal4* auf die SOPs beschränkt (N).

Der Balken in (A, F) entspricht 30 $\mu$ m, in (K) 50 $\mu$ m, in (D, I) 12,5 $\mu$ m.

im anterioren Bereich des Notums war eine starke Expression des Reporterkonstrukts festzustellen (Abb. 30 F). Wie eine Überlagerung mit dem Hnt-Kanal zeigt, kann in allen Zellen die *OC10-lacZ* exprimierten auch eine Hnt-Färbung gefunden werden (Abb. 30 H, s. auch Ausschnittsvergrößerung in J). Die Zellen, die bei einer Überexpression das Reporterkonstrukt ektopisch aktivieren, sind demnach ektopische SOPs. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine klonale Überexpression von *klu*. In Flügelimaginalscheiben in denen *klu* mittels des FLP/FRT-Systems (s.o.) in Klonen überexprimiert wurde, war eine massive Aktivierung des künstlichen SOP-Enhancers in allen Bereichen der Scheibe zu beobachten (Abb. 30 K-N). Wie in dem Experiment zuvor, waren es auch hier ausschließlich SOPs in denen der Reporter aktiviert wurde.

Durch die beiden Experimente konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von *klu* der SOP-Enhancer ektopisch aktiviert wird. Vermutlich wird in einzelnen Zellen die proneurale Aktivität derart erhöht, dass sie den SOP-Enhancer ektopisch aktiviert und die Zellen sich dementsprechend zu SOPs differenzieren. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die zuvor beschriebene Aktivierung des *sc-lacZ*-Reporters nicht auf eine Erhöhung der allgemeinen Expression von *sc* zurückzuführen ist, sondern zumindest zu einem großen Teil durch die ektopische Aktivierung des SOP-Enhancers verursacht wird.

Als zusammenfassendes Ergebnis dieser Studien ist festzuhalten, dass die Überexpression von *klu* zu einer Erhöhung der proneuralen Aktivität führt. Diese Aktivitätserhöhung beruht jedoch vermutlich nicht darauf, dass *klu* die generelle Expression der proneuralen Gene beeinflusst, vielmehr scheint durch die Überexpression von *klu* die proneurale Aktivität oder Sensitivität der Zellen gegenüber der vorhandenen proneuralen Aktivität erhöht zu werden.

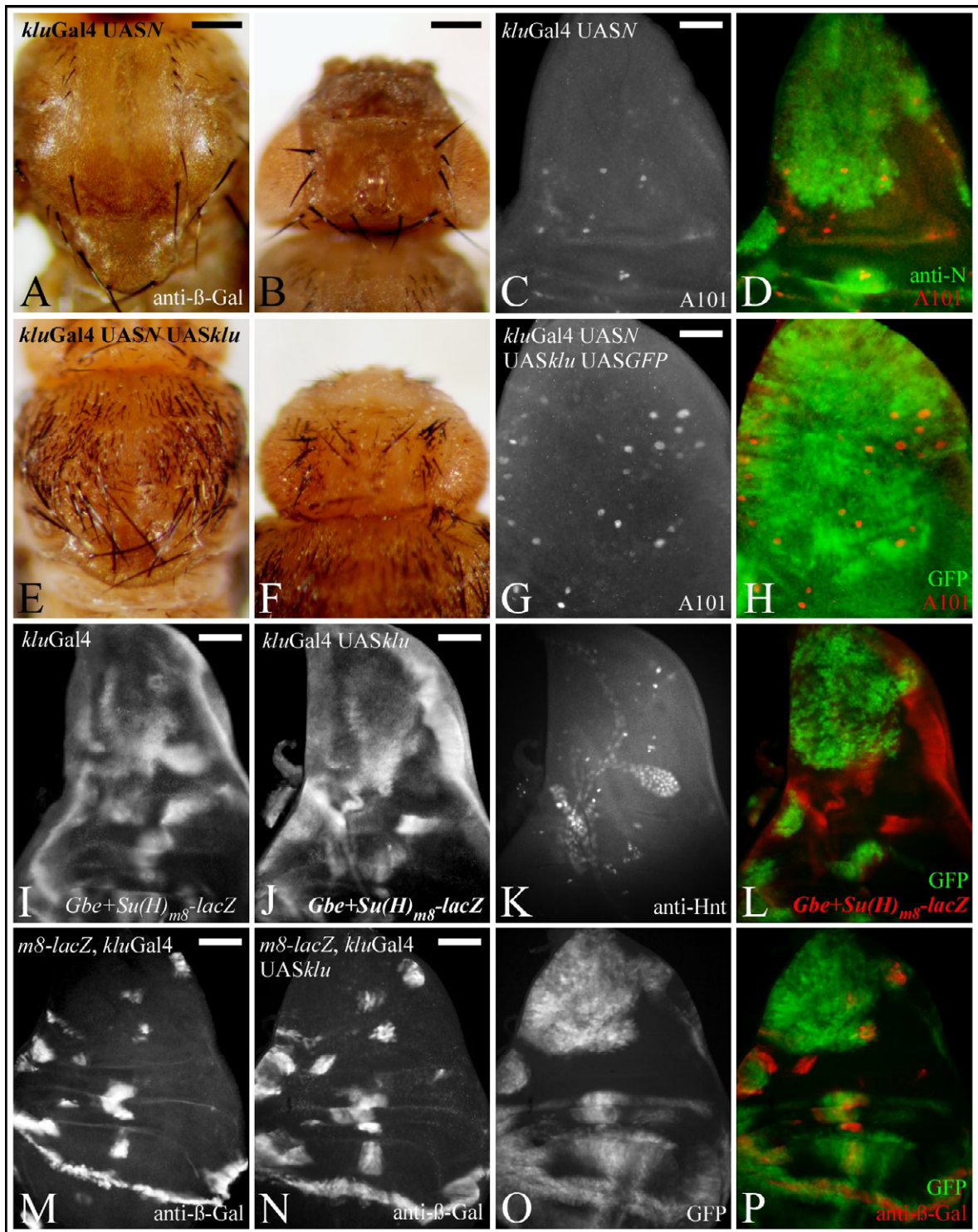
Da Klu als Repressor agiert, ist es möglich, dass Klu die Aktivität bzw. Expression der Antagonisten der proneuralen Aktivität reprimiert. Im Folgenden wurde daher die funktionelle Beziehung zwischen Klu und bekannten Gegenspielern von Ac und Sc untersucht.

## **2.4 Untersuchung der funktionellen Beziehung zwischen Klu und dem Notch-Signalweg**

Ein wichtiger Antagonist der proneuralen Faktoren ist der Notch-Signalweg (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Er unterdrückt die proneurale Aktivität, indem er die Expression der Gene des *Enhancer of split Komplexes (E(spl)-K)* anschaltet. Sieben Gene des *E(spl)-K* kodieren genau wie die proneuralen Gene für Faktoren mit einem bHLH-Motiv (Bailey und Posakony, 1995). Diese Faktoren agieren als Repressoren der Transkription und unterdrücken u.a. die Expression der Zielgene von Ac und Sc. Neuere Studien zeigen

zudem, dass sie auch nicht-funktionale Heterodimere mit den proneuralen Proteinen ausbilden und dadurch die proneurale Aktivität herabsetzen (Giagtzoglou et al., 2003). Hinweise darauf, dass *klu* möglicherweise die Aktivität des Notch-Signalwegs regulieren könnte lieferten Co-Expressionsstudien von *klu* und *N*. Eine Überexpression von *N* führt normalerweise dazu, dass innerhalb der proneuralen Cluster weniger Zellen das neurogene Entwicklungsschicksal annehmen. Dementsprechend führte die Überexpression von UAS-*N* zu einem starken Verlust von mechanosensorischen Borsten. Als Beispiel ist in Abb. 31 A, B der Thorax und der Kopf einer Fliege gezeigt, in der UAS-*N* mit *kluGal4* überexprimiert wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl weniger Macro- als auch weniger Microchaeten gebildet wurden. In Flügelimaginalscheiben in denen UAS-*N* überexprimiert wurde, konnten entsprechend weniger A101-positive SOPs detektiert werden (Abb. 31 C, D). Der durch die *N*-Überexpression induzierte Verlust der Borsten kann verhindert werden, wenn parallel zu UAS-*N* auch UAS-*klu* exprimiert wird. Wie in Abb. 31 E, F zu sehen, führte die Co-Überexpression von *klu* und *N* zur Ausbildung eines stark unregelmäßigen Borstenmusters. An vielen Stellen der adulten Fliege wurden zusätzliche bzw. ektopische Borsten gebildet, z.B. Microchaeten auf dem Scutellum bzw. zusätzliche Macrochaeten im Bereich der Dorsozentralen und am Kopf. Dennoch gibt es auch bei diesen Individuen noch einige Stellen, an denen weniger Borsten gebildet werden als im Wildtyp, z.B. in einem schmalen Streifen in der Mitte des Notums. Insgesamt betrachtet ähnelt der bei der Co-Überexpression von *klu* und *N* gebildete Phänotyp jedoch stark dem Überexpressionsphänotyp von *klu*. Dies zeigte sich auch bei der Untersuchung der Flügelimaginalscheiben. Hier führte die Co-Expression zur Bildung zahlreicher ektopischer SOPs. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der ektopisch gebildeten SOPs zu Scheiben, in denen nur UAS-*klu* exprimiert wurde, war nicht festzustellen (vgl. Abb. 31 G mit Abb. 6 C).

Die Tatsache, dass bei einer Co-Expression von UAS-*N* und UAS-*klu* der normale *N*-Phänotyp unterdrückt wird, führte zu der Vermutung, dass *klu* möglicherweise die Aktivität des Notch-Signalwegs regulieren kann. Um dies zu testen, wurde die Notch-Aktivität in *klu*-überexprimierenden Flügelimaginalscheiben mit Hilfe eines speziellen Reporterkonstrukts (Gbe + Su(H)<sub>m8</sub>) analysiert. Dieses Reporterkonstrukt wurde im Labor von Sarah Bray in Cambridge generiert und setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen (Furriols und Bray, 2000). Neben dem *lacZ*-Gen und einem hsp70-Minimalpromotor enthält das Konstrukt die Promoterregion des *grainyhead* (*grh*)-Gens und vier Bindungssequenzen für das Su(H)-Protein. Der *grh*-Promotor ermöglicht normalerweise eine ubiquitäre Expression des Reporters. Diese wird jedoch durch die Su(H)-Bindungsstellen verhindert, da Su(H) in Abwesenheit von Notch als Repressor agiert (Barolo et al., 2002; Furriols und Bray, 2000). Nur in den Zellen, in denen der



**Abb. 31: Einfluss der Überexpression von *klu* auf die Aktivität des Notch-Signalwegs**

(A-H) Die Co-Expression von UAS-*N* und UAS-*klu* unterdrückt den für die Expression von *N* charakteristischen Verlust von SOPs bzw. Borsten: Fliegen bzw. Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums in denen entweder nur UAS-*N* (A-D) oder UAS-*N* zusammen mit UAS-*klu* (E-H) unter Kontrolle der Aktivatorlinie *kluGal4* exprimiert wurde. In den Flügelimaginalscheiben wurden die SOPs durch eine anti-β-Gal-Antikörperfärbung gegen den SOP-Marker A101 nachgewiesen. (A-D) Die Überexpression von *N* (grün in D) führt zur Bildung von weniger SOPs (C, D) und folglich zu einer starken Reduktion der Borstenzahl. Exemplarisch gezeigt sind Notum (A) und Kopf (B). (E-H) Im Gegensatz dazu kommt es bei der Co-Expression von UAS-*N* und UAS-*klu* zur Bildung ectopischer SOPs (G, H) und dementsprechend zur ectopischen Borstenbildung (E, F). (Fortsetzung auf folgender Seite)

(I-P) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen entweder die Aktivität des Notch-Signalwegs oder die Expression eines *E(spl)m8-lacZ*-Reporters analysiert wurde. (I-L) Die Aktivität des Notch-Signalwegs wurde mit Hilfe eines speziellen *lacZ*-Reporterkonstrukts (*Gbe* + *Su(H)<sub>m8</sub>*) untersucht. Der Vergleich mit einer sonst wildtypischen Scheibe (I) zeigt, dass es bei einer Expression von UAS-*klu* aktiviert durch *kluGal4* zu keiner offensichtlichen Änderung der *Gbe* + *Su(H)<sub>m8</sub>-lacZ*-Expression kommt (J, L). Folglich wird durch eine Überexpression von *klu* die Aktivität des Notch-Signalwegs nicht beeinflusst. (M-P) Die Überexpression von *klu* hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression des Notch-Zielgens *E(spl)m8*. (M) Expression eines *E(spl)m8-lacZ*-Reporters. Die Expression des Reporters reflektiert das normale *E(spl)m8*-Expressionsmuster und wurde mit einem anti- $\beta$ -Gal Antikörper nachgewiesen. (N-P) Bei der Expression von UAS-*klu* aktiviert durch *kluGal4* bleibt das *E(spl)m8-lacZ*-Expressionsmuster unverändert. Der Balken in (A, B) entspricht 200 $\mu$ m, in (I, J, M, N) 50 $\mu$ m, in (C, G) 30 $\mu$ m.

Notch-Signalweg aktiv ist, wird Su(H) in einen Transkriptionsaktivator umgewandelt und das *lacZ*-Gen exprimiert. Das bedeutet, dass nur die Zellen, in denen der Notch-Signalweg aktiv ist, durch eine anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung angefärbt werden können.

Eine Flügelimaginalscheibe, in der die Expression des *Gbe* + *Su(H)<sub>m8</sub>*-Reporters durch eine anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung nachgewiesen wurde, ist in Abb. 31 I gezeigt. Die gefärbten Zellen repräsentieren das normale Notch-Aktivitätsmuster in einer Flügelimaginalscheibe des späten dritten Larvenstadiums. Sollte Klu tatsächlich die Aktivität des Notch-Signalwegs beeinflussen, würde erwartet, dass sich bei einer Überexpression von *klu* das Notch-Aktivitätsmuster ändert. Das war jedoch nicht der Fall. Bei einer Überexpression von *klu* konnte keine offensichtliche Änderung in der Expression von *Gbe* + *Su(H)<sub>m8</sub>* festgestellt werden. Insbesondere im Bereich des Notums, in dem *klu* stark exprimiert wurde, zeigen beide Scheiben ein fast identisches Expressionsmuster des Reporterkonstrukts (vgl. Abb. 31 I und J). Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass Klu die Aktivität von Notch direkt reguliert. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass Klu weiter stromabwärts in der Notch-Signalkaskade wirkt und z.B. reprimierenden Einfluss auf die Expression der Zielgene von Notch ausübt. Um dies zu testen, wurde die Expression eines repräsentativen Notch Zielgens, *E(spl)m8*, untersucht. *E(spl)m8* gehört zu den Genen des *E(spl)*-K und ist zusammen mit einem weiteren Gen dieses Komplexes, *E(spl)m7*, an der Selektion der SOPs in der Flügelimaginalscheibe beteiligt. Beide Gene werden dementsprechend in allen proneuralen Clustern der Flügelimaginalscheibe exprimiert (Bailey und Posakony, 1995; de Celis et al., 1996; Singson et al., 1994). Die Expression von *E(spl)m8* wurde hier mit Hilfe eines *lacZ*-Reporterkonstrukts (*m8-lacZ*) analysiert. Eine Imaginalscheibe des dritten Larvenstadiums, in der die Expression des *m8-lacZ*-Reporters mit einem anti- $\beta$ -Gal-Antikörper nachgewiesen wurde, ist in Abb. 31 M zu sehen. Das Expressionsmuster des Reporterkonstrukts repräsentiert die normale Expression des *E(spl)m8*-Gens. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* keinen Einfluss auf die normale Expression des *m8-lacZ*-Reporters hatte (vgl. Abb. 31 M und N). Obwohl ein Großteil der *E(spl)m8*-

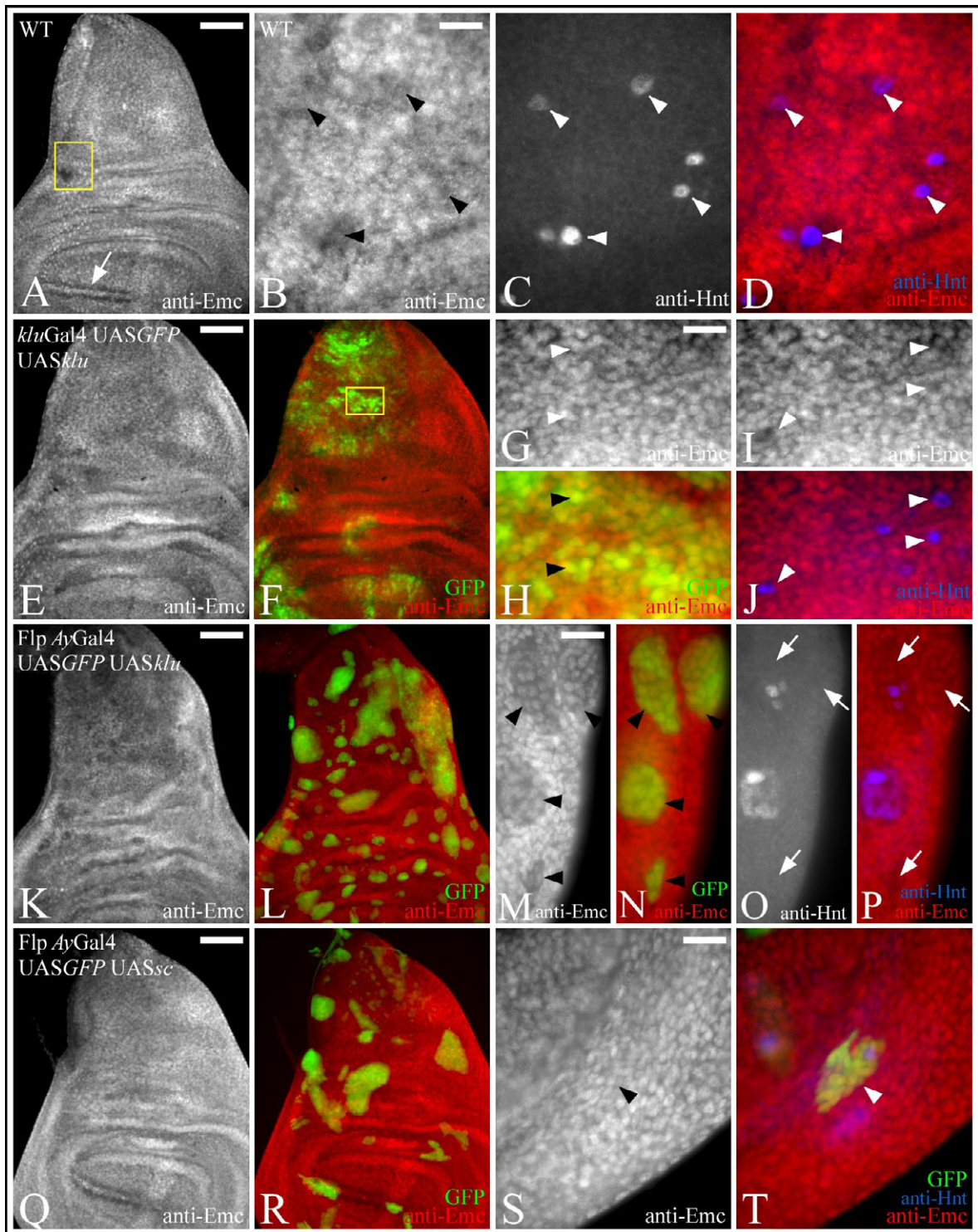
Expressionsdomänen mit den Bereichen der *klu*-Expression überlappen (Abb. 31 P), konnte weder eine Veränderung im Expressionsmuster noch in der Expressionsstärke von *m8-lacZ* festgestellt werden. Insbesondere eine Abschwächung der Expression, wie man sie bei einem reprimierenden Einfluss von Klu erwartet hätte, war nicht zu beobachten. Die Überexpression von *klu* hat demnach keine Auswirkung auf die Expression des *E(spl)m8*-Gens.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Klu nicht über den Notch-Signalweg wirkt. Weder die Aktivität des Signalwegs noch die Expression der Zielgene werden durch eine Überexpression von *klu* beeinflusst bzw. reprimiert.

## 2.5 Untersuchung der funktionellen Beziehung zwischen Klu und Emc

Ein weiterer Faktor, dem eine wichtige Funktion bei der Regulation der proneuralen Aktivität zukommt, ist *emc*. *emc* kodiert für ein Protein mit einem HLH-Motiv ohne DNA-Bindungsdomäne. Es ist in der Lage, inaktive Heterodimere mit beiden proneuralen Proteinen auszubilden und dadurch die proneurale Aktivität herabzusetzen (Cabrera et al., 1994; Campuzano, 2001; Garrell und Modolell, 1990). Emc wirkt somit als Antagonist proneuraler Aktivität und ist ein potentielles Angriffsziel für die Aktivität von Klu. Es ist denkbar, dass Klu die proneurale Aktivität reguliert, indem es die Expressionsstärke von *emc* steuert. Eine Überexpression von *klu* sollte zu einer verminderten Expression von *emc* führen. Um dies zu testen, wurden die Expression von *emc* in Flügelimaginalscheiben mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen Emc analysiert. Emc wird normalerweise ubiquitär in der gesamten Flügelimaginalscheibe exprimiert. Allerdings gibt es regionale Unterschiede in der Expressionsstärke, mit Tälern der Expression im Bereich der proneuralen Felder und Bereichen höherer Expression außerhalb der Ac/Sc-Expressionsdomänen (Cubas und Modolell, 1992; Van Doren et al., 1992). In der in Abb. 32 A gezeigten, mit einem anti-Emc-Antikörper gefärbten Imaginalscheibe können diese regionalen Unterschiede nur erahnt werden. Eine deutliche Herabsetzung der *emc*-Expression ist nur an der anterioren d/v Grenze zu erkennen (Pfeil in Abb. 32 A). Im Bereich des Notums sind regionale Unterschiede in der Expressionsstärke weniger klar ausgeprägt. Die Überlagerung der anti-Emc-Färbung mit einer parallel durchgeführten anti-Hnt-Färbung zeigte, dass eine geringere *emc*-Expression insbesondere in den Hnt-positiven Zellen, also in den SOPs, festzustellen war (Abb. 32 B-D). Eine generelle Herabsetzung der Expression in den Bereichen der proneuralen Cluster kann jedoch nicht festgestellt werden.

Ein fast identisches Expressionsmuster von *emc* findet sich auch in Flügelimaginalscheiben, in denen UAS-*klu* mit *kluGal4* überexprimiert wurde (Abb.32 E-J). Eine offen-



**Abb. 32: Einfluss der Überexpression von *klu* auf die *emc*-Expression**

(A-T) Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums, in denen die Auswirkungen einer Überexpression von UAS-*klu* auf die *emc*-Expression analysiert wurde. Die *emc*-exprimierenden Zellen wurden durch eine anti-Emc-, die SOPs durch eine anti-Hnt-Antikörperfärbung nachgewiesen. (A-D) Expression von Emc in einer wildtypischen Imaginalscheibe. (A) Die Expression erfolgt ubiquitär in allen Zellen. Deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke in verschiedenen Regionen der Scheibe sind nicht zu erkennen. Einzige Ausnahme sind die SOPs des anterioren Flügelrands, die eine deutliche Verringerung der *emc*-Expression zeigen (Pfeil). (B-D) Ausschnittsvergrößerung des in (A) umrahmten Bereichs. Durch die Überlagerung von anti-Emc- (rot) und anti-Hnt-Kanal (blau) wird deutlich, dass auch in den SOPs des Notums die *emc*-Expression verringert wird (Pfeile). (Fortsetzung auf folgender Seite)



(E-J) Die Expression von UAS-*klu* aktiviert durch *kluGal4* führt zu keiner signifikanten Änderung der *emc*-Expression. (E, F) Innerhalb der *klu*-Expressionsdomäne (markiert durch GFP, grün in F) ist im Vergleich zu (A) keine offensichtliche Änderung der *Emc*-Färbung zu erkennen. (G-J) Ausschnittsvergrößerung des in (E, F) umrahmten Bereichs. Selbst in Zellen mit starker *klu*-Expression ist keine Änderung der *emc*-Expression festzustellen (Pfeilköpfe in G, H). Nur in den SOPs kann eine leichte Verringerung der *emc*-Expression beobachtet werden (Pfeilköpfe in I, J). (K-P) Überexpression von UAS-*klu* in Klonen, die durch eine Kombination des UAS/Gal4-Systems und Flp/FRT vermittelter Rekombination induziert wurden. (K-L) Die klonale Überexpression von *klu* führt zu einer offensichtlichen Verringerung der *emc*-Expression innerhalb der Klone. (M-P) Vergrößerte Darstellung eines Randbereichs der Flügeltasche (in K, L nicht zu sehen). (M, N) In den durch Pfeilköpfe markierten Klonen, führt die Überexpression von *klu* zu einer deutlichen Verringerung der *emc*-Expression. (O, P) Durch die Überlagerung von anti-*Emc*- (rot) und anti-*Hnt*-Kanal (blau) wird deutlich, dass die *emc*-Expression in allen Zellen des Klons und nicht nur in den SOPs verringert wird. Die Pfeile verweisen auf Zellen innerhalb der Klone die keine *Hnt*-Färbung zeigen, aber eine deutlich verringerte *emc*-Expression aufweisen. (Q-T) Im Gegensatz zur klonalen Überexpression von *klu* hat die Überexpression von UAS-*sc* in Klonen keine Auswirkung auf die normale *emc*-Expression.

Der Balken in (A, E, K, Q) entspricht 50µm, in (B, G, M, S) 12,5µm.

sichtliche, großflächige Änderung der *emc*-Expression in den Bereichen, in denen *Klu* überexprimiert wird, ist nicht zu erkennen. Auch in einzelnen Zellen, die eine hohe *klu*-Expression aufweisen, wird die Expression von *emc* nicht signifikant geändert (Abb. 32 G, H). Die einzigen Zellen, die bei einer Überexpression von *klu* eine erkennbar verminderte Expression von *emc* zeigen, sind auch in diesem Fall die SOPs (Abb. 32 I, J). Obwohl diese Ergebnisse zunächst gegen die Annahme sprechen, dass *Klu* die Expressionsstärke von *emc* reguliert, zeigte sich in einem weiteren Experiment, dass *Klu* möglicherweise doch einen Einfluss auf die Expression von *emc* ausübt. In diesem Experiment wurde in Flügelimaginalscheiben UAS-*klu* mit Hilfe des Flp/FRT-Systems in Klonen überexprimiert (s.o). Im Gegensatz zur reinen Überexpression von *klu* mit *kluGal4* hatte die ektopische Expression in Klonen einen deutlichen Einfluss auf die *emc*-Expression in der Flügelimaginalscheibe. Bereits in der Übersicht ist deutlich zu erkennen, dass an zahlreichen Stellen, an denen sich *klu*-exprimierende Klone gebildet haben, die *emc*-Expressionsstärke vermindert ist (Abb. 32 K, L). Dabei scheint es unerheblich zu sein, an welcher Position in der Scheibe sich die Klone befinden. Sowohl im Bereich des Notums, als auch im Bereich der Flügeltasche, ist eine verminderte *emc*-Expression in den Klonen festzustellen. Die geringere Expressionsstärke ist besonders gut in der Ausschnittsvergrößerung in Abb. 32 M, N zu erkennen. Hier zeigt sich, dass alle Zellen des jeweiligen Klons eine geringere *emc*-Expression aufweisen als die benachbarten wildtypischen Zellen. Die durch dieses System induzierte starke und anhaltende Aktivierung der *klu*-Expression scheint demnach einen negativen Einfluss auf die *emc*-Expression auszuüben. Es stellt sich allerdings die Frage, ob dies eine direkte Folge der *Klu*-Aktivität ist oder ob sie darauf zurückzuführen ist, dass sich die Zellen der Klone zu SOPs differenzieren und diese dann, genau wie im Wildtyp, die Expression von *emc* herunterregulieren. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde die Anzahl der

gebildeten SOPs in den Klonen analysiert. Dazu wurden die Kanäle der *emc*-Expression und der Hnt-Färbung überlagert und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass in einigen Klonen noch gar keine Hnt-positiven Zellen detektiert werden konnten (Pfeile in Abb. 32 O, P) und dass in anderen Klonen nur ein Teil der Zellen eine SOP-spezifische Hnt-Färbung aufwies. Demnach hat sich ein Großteil der Zellen nicht zu SOPs differenziert, dennoch ist auch in diesen Zellen die Expression von *emc* deutlich verringert. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die *emc*-Expression in den Zellen unabhängig vom SOP-Schicksal herunterreguliert wird und dass die verringerte Expression eine direkte Konsequenz der *klu*-Überexpression ist. Dafür spricht auch das folgende Experiment, in dem die klonale Überexpression mit dem proneuralen Gen *sc* wiederholt wurde. Wie bereits im Abschnitt 2.2.3 gezeigt, führt eine klonale Überexpression von UAS-*sc* ebenfalls zur Bildung von ektopischen SOPs in den Klonen (Abb. 23 G). In dem hier durchgeführten Experiment zeigte sich jedoch, dass die klonale Überexpression von *sc* im Gegensatz zu der von *klu* keinen Einfluss auf die Expressionsstärke von *emc* hat (Abb. 32 K-N). In den *sc*-exprimierenden Klonen ist die *emc* Expression unverändert. Ein Unterschied zu den benachbarten wildtypischen Zellen kann auch in der Ausschnittsvergrößerung nicht festgestellt werden (Abb. 32 M, N). Die einzigen Zellen, die in den Klonen eine verminderte anti-Emc-Färbung zeigen, sind, genau wie im Wildtyp, die Hnt-positiven SOPs. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine reine Erhöhung der proneuralen Aktivität nicht ausreicht, um die Expression von *emc* zu beeinflussen. Die verminderte *emc* Expression in den *klu*-exprimierenden Klonen scheint demnach spezifisch für *Klu* zu sein und direkt von *Klu* abzuhängen.

### 3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors *klumpfuss* (*klu*) während der Entwicklung des adulten peripheren Nervensystems von *Drosophila melanogaster* untersucht. Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war die Beobachtung, dass in *klu*-mutanten Individuen nur noch eine reduzierte Anzahl an Vorläuferzellen der Borstensinnesorgane (SOPs) gebildet wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Klu an der Determination der SOPs beteiligt ist und im Rahmen eines bisher noch nicht beschriebenen Regulationsmechanismus wirkt. Klu ist vermutlich Teil eines Repressorkomplexes, der die Expression von Genen reguliert, die Repressoren der neuronalen Entwicklung kodieren. Durch diesen doppelt-negativen Mechanismus verstärkt Klu wahrscheinlich die proneurale Aktivität, bzw. senkt es den Schwellenwert für die SOP-Entwicklung.

#### 3.1 Klu ist an der Determination der SOPs beteiligt

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bereits bekannt, dass in *klu*-mutanten Flügel-imaginalscheiben nur noch eine reduzierte Anzahl an SOPs gebildet wird. Dies führte zu der Annahme, dass Klu entweder an der Determination der SOPs oder bei ihrer weiteren Differenzierung beteiligt ist (Klein und Campos-Ortega, 1997).

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde eine Überexpressionsstudie mittels des UAS/Gal4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) durchgeführt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Klu eine Funktion bei der Determination der SOPs besitzt. Bei der Überexpression eines UAS-*klu*-Konstrukts mit der Aktivatorlinie *kluGal4* bildeten sich zahlreiche ektopische SOPs, die durch Antikörperfärbungen gegen SOP-spezifische Marker wie Hindsight, Sensless oder A101-lacZ nachgewiesen werden konnten (Abb. 6). Dabei wurde durch die Verwendung der Aktivatorlinie *kluGal4* die Expression von *klu* nur in den Zellen erhöht, die auch normalerweise *klu* exprimieren. Die Erhöhung der Klu-Konzentrationen reichte dabei aus, damit sich aus eigentlich epidermalen Zellen neuronale Vorläuferzellen entwickelten. Bei der Aktivierung der *klu*-Expression mit *kluGal4* entwickelten sich innerhalb der *klu*-Expressionsdomäne jedoch nicht alle, sondern nur vereinzelte Zellen zu SOPs (Abb. 6). Es stellt sich somit die Frage, warum Klu an manchen Positionen in der Lage ist, das neuronale Zellschicksal zu induzieren, an anderen jedoch nicht.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Klu nicht unabhängig, sondern nur gemeinsam mit anderen Faktoren die Bildung der SOPs fördern kann. Die räumliche Verteilung dieser anderen Faktoren könnte einen starken Einfluss auf die Entscheidung haben, welche

Zellen das neuronale Schicksal annehmen und sich zu SOPs entwickeln. Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung, dass sich die zusätzlichen SOPs nicht homogen in der gesamten *klu*-Expressionsdomäne verteilen, sondern hauptsächlich in Bereichen auftreten, in denen sich auch normalerweise proneurale Cluster bilden. Es wäre demnach denkbar, dass *klu* zusammen mit den proneuralen Genen *ac/sc* die Bildung der SOPs reguliert.

Ein zweiter Erklärungsansatz beruht auf der Beobachtung, dass innerhalb der Expressionsdomäne von *Klu* einzelne Zellen *klu* unterschiedlich stark exprimieren (Abb. 6). Es ist daher denkbar, dass bei einer Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* sich nur diejenigen Zellen zu SOPs entwickeln, in denen die *klu*-Expression einen gewissen Schwellenwert übersteigt. Für diese Argumentation spricht die Tatsache, dass sich bei einer klonalen Überexpression von *klu*, bei der es zu einer gleichmäßig starken und anhaltenden Aktivierung der Expression kommt, zahlreiche Zellen des Klon zu SOPs entwickeln (Abb. 23 A-C) (s.u.). Da dies unabhängig von der Position erfolgt, an der sich der Klon befindet, d.h. auch außerhalb der proneuralen Cluster, könnte allein die starke Aktivierung der *Klu*-Expression ausreichen, um den neuronalen Entwicklungsweg zu induzieren. Allerdings wird vermutet, dass die proneuralen Gene in geringen Konzentrationen auch außerhalb der proneuralen Cluster exprimiert werden, so dass diese geringe proneurale Expressionsstärke in Verbindung mit der hohen und anhaltenden *klu*-Expression möglicherweise ausreichen, um die Bildung ektopischer SOPs zu induzieren.

Die Unterschiede in der Stärke des ausgeprägten Phänotyps, d.h. in der Anzahl der ektopisch gebildeten SOPs bei der klonalen Expression von *Klu* im Vergleich zu einer Überexpression mit *kluGal4*, kann auf folgende Weise erklärt werden. Die klonale Expression führt zu einer anhaltenden und starken Expression von *klu*, die bei einer Expression mit *kluGal4* nicht erzielt werden kann. Dies liegt zum einen daran, dass die Aktivatorlinie *kluGal4* der endogenen Kontrolle des *klu*-Promoters unterliegt. Zum anderen sind die Tiere sehr sensitiv gegenüber zu hohen *Klu*-Konzentrationen. So führt z.B. eine Expression von UAS-*klu* mit *kluGal4* bei starken *Klu*-Linien bzw. Temperaturen von über 25°C zu embryonaler Letalität. Das bedeutet, dass sich diejenigen Tiere, die *klu* in entsprechend hohen Dosen exprimieren, nicht bis zu einem analysierbaren Stadium entwickeln. Diese Dosissensitivität ist dadurch zu erklären, dass *Klu* nicht nur an der Determination der SOPs beteiligt ist, sondern noch zahlreiche andere Funktionen während der Ontogenese besitzt; u.a. ist es an der Entwicklung des embryonalen ZNS und des larvalen Gehirns beteiligt (Klein und Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997).

Die Überexpression von *klu* führt nicht nur zu einer vermehrten SOP-Bildung, sondern scheint außerdem die Entwicklung der SOPs zu beschleunigen. So konnten in Flügel-imaginalscheiben des dritten Larvenstadiums SOPs an Positionen nachgewiesen werden,

in denen sie sich normalerweise erst während der pupalen Phase entwickeln. Hierzu zählt z.B. die Region um das PS-Cluster (Abb. 6). Interessanterweise beschleunigte die Überexpression von *klu* auch die Entwicklung der Vorläuferzellen der nicht innervierten Borsten am posterioren Flügelrand (Abb. 7). *Klu* scheint demnach ebenfalls eine Funktion bei der Bildung dieser Vorläuferzellen zu besitzen.

Bei den Individuen, die sich bis zum adulten Stadium entwickelten, führte die Überexpression von *klu* entsprechend der vermehrten SOP-Bildung zur Ausbildung vieler zusätzlicher und ektopischer Borsten, die sich über den gesamten Körper verteilten (Abb. 5). Die weitere Analyse des adulten Phänotyps zeigte, dass sowohl zusätzliche Macroals auch vermehrt Microchaeten gebildet wurden. Es muss daher angenommen werden, dass *klu* sowohl während der larvalen Entwicklung als auch während des pupalen Stadiums an der Determination der SOPs beteiligt ist. Die zusätzlichen Borsten wurden an Stellen gefunden, an denen auch normalerweise Borsten vorkommen, wie z.B. auf dem Notum, dem Kopf, dem ersten und zweiten Segment der Antennen sowie am vorderen Flügelrand, aber auch in ektopischen Positionen, in denen sich normalerweise keine Borsten bilden. Hierzu zählten neben der Pleura auch die Halteren und das 3. Segment der Antenne. In diesen Strukturen wird die Borstenbildung üblicherweise dadurch verhindert, dass die Expression der proneuralen Gene *ac* und *sc* aktiv reprimiert wird. Im Falle der Halteren erfolgt dies durch das homöotische Gen *Ubx*, in den Antennen durch das proneurale Gen *amos*. Da bei einer Überexpression von *klu* dennoch Borsten gebildet werden, besteht die Möglichkeit, dass entweder durch die Erhöhung der *Klu*-Konzentration die inhibitorischen Effekte vermindert bzw. umgangen werden, oder dass *Klu* hier unabhängig von den proneuralen Genen *ac/sc* in der Lage ist, die Bildung mechanosensoryischer Organe zu induzieren. Wie *Klu* tatsächlich in diesen Organen die Bildung ektopischer Borsten induzieren kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, ist aber ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten.

### 3.2 Strukturanalyse von *Klu*

Um einen Anhaltspunkt für die Funktionsweise von *Klu* zu erhalten, wurde die primäre Aminosäuresequenz in einer Datenbankanalyse auf konservierte, funktionale Domänen hin untersucht. Diese Analyse ergab, dass *Klu* außer den bereits bekannten Zink-Finger-Motiven nur noch eine potentielle coiled coil-Region im N-terminalen Teil des Proteins besitzt (Abb. 8 A). Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch, dass dieses Motiv keine Funktion für die Aktivität von *Klu* besitzt (s.u). Da keine weiteren Motive gefunden wurden, gibt die Analyse der konservierten Domänen in *Klu* somit wenig Aufschluss über eine mögliche Funktion des Proteins. Es ist möglich, die durch *klu* kodierte primäre Aminosäuresequenz grob in zwei Regionen zu unterteilen. Die eine Region umfasst die

Aminosäuren 1-583 und wird in dieser Arbeit als N-Terminus bezeichnet. Sie enthält das coiled coil-Motiv und die bereits zuvor beschriebenen drei Kernlokalisierungssequenzen (Klein und Campos-Ortega, 1997). Da der N-Terminus keine offensichtliche Homologie zu anderen Proteinen besitzt (Klein und Campos-Ortega, 1997), konnte ihm bisher keine Funktion zugeschrieben werden. Die zweite Region, der C-Terminus, umfasst die Aminosäuren 584-803 und enthält vier Zink-Finger-Motive, von denen die letzten drei eine starke Homologie zu den Zink-Fingern der EGR-Transkriptionsfaktoren (EGR = Early Growth Response) besitzen. Klu wird daher ebenfalls zur EGR-Familie gezählt (Klein und Campos-Ortega, 1997). Eine Funktion des C-Terminus besteht darin, die DNA-Bindung von Klu zu vermitteln. Dies konnte bereits in früheren *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, in denen der Nachweis gelang, dass die Zink-Finger im C-Terminus von Klu an eine DNA-Sequenz binden, die der Konsensussequenz der EGR-Familie entspricht (Thomas Klein, pers. Kommunikation). Trotz dieser Erkenntnisse und der bestehenden Homologie der Zink-Finger zur EGR-Familie, ist es nicht möglich, Rückschlüsse auf die Funktion bzw. mögliche Zielgene von Klu zu ziehen. Das liegt hauptsächlich daran, dass die vornehmlich bei den Vertebraten vorkommenden EGR-Transkriptionsfaktoren an einer Vielzahl von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind (Madden und Rauscher, 1993; O'Donovan et al., 1999).

Da sich durch die Suche nach konservierten Domänen und möglichen Homologien keine weiteren Erkenntnisse über die Funktion des Proteins ergeben haben, wurde durch eine Deletionsanalyse versucht, die Funktion der verschiedenen Bereiche des Klu-Proteins näher zu bestimmen. Für diese Analyse wurden zahlreiche Deletionskonstrukte von Klu hergestellt, in denen entweder der C- bzw. der N-Terminus sukzessive verkürzt wurden oder denen interne Bereiche fehlten (Abb. 8). Die Funktionalität der Konstrukte wurde dahingehend untersucht, ob sie bei einer Überexpression mit *kluGal4* noch in der Lage waren, den für die Überexpression von *klu* charakteristischen Borstenphänotyp zu induzieren. Als weiteres Kriterium für ihre Funktionalität wurde der hervorgerufene Beinphänotyp herangezogen. Dieser ist bei einer Überexpression von *klu* ebenfalls charakteristisch und gekennzeichnet durch Deformationen sowie Fusionen im Bereich der tarsalen Segmente. Die Fusion der Konstrukte mit einem Hämagglutinin-Epitop ermöglichte es, trotz des Fehlens eines funktionalen Klu-Antikörpers, die Expression der Deletionskonstrukte in Imaginalscheiben durch eine HA-spezifische Antikörperfärbung unmittelbar nachzuweisen und die subzelluläre Lokalisierung verschiedener Konstrukte zu überprüfen (s.u.).

### 3.3 Teile des N-Terminus sind essentiell für die Funktion von Klu

Ein wichtiges Ergebnis der Struktur-Funktionsanalyse war, dass der N-terminale Teil des Proteins essentiell für die hier untersuchte Funktion von Klu ist. Fehlt dieser Abschnitt vollständig, führt dies zu einem nahezu kompletten Funktionsverlust des Proteins. Dies konnte anhand einer Überexpressionsanalyse von einem Konstrukt gezeigt werden, das nur die Aminosäuren 584-803 enthielt (HA-Klu $\Delta$ 1-583). Die Überexpression dieses C-terminalen Fragments hatte nur noch sehr geringe Auswirkungen auf die Borstenbildung (Abb. 11). Es muss daher angenommen werden, dass HA-Klu $\Delta$ 1-583 nur noch eine geringfügige Restaktivität besitzt.

Diese geringfügige Restaktivität zeigte sich auch bei dem Versuch, *klu*-Mutanten (*klu*<sup>R51</sup>/*kluGal4*) durch die Überexpression dieses Konstrukts zu retten. Die Rettung von *klu*-Mutanten durch eine Überexpression ist normalerweise äußerst problematisch, da die Fliegen sehr sensitiv gegenüber veränderten Klu-Konzentrationen reagieren und die Expression von UAS-*klu*, auch in einem *klu*-mutanten (*klu*<sup>R51</sup>/*kluGal4*) Hintergrund, häufig zu einem Überexpressionsphänotyp und damit zu Letalität führt. Durch die Expression des C-terminalen Fragments (HA-Klu $\Delta$ 1-583) war es jedoch möglich, den mutanten Phänotyp leicht abzuschwächen, ohne einen Überexpressionsphänotyp hervorzurufen. Dies kann als Beleg dafür gewertet werden, dass dieses Fragment noch eine gewisse Aktivität besitzt, diese aber sehr schwach zu sein scheint.

Durch die Deletion des N-Terminus wurden alle bisher bekannten Kernlokalisierungssequenzen von Klu entfernt. Interessanterweise konnte dennoch eine nukleare Lokalisierung des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden (Abb. 11 E-G). Dies deutet darauf hin, dass auch im C-terminalen Teil von Klu eine Kernlokalisierungssequenz vorhanden sein muss. Diese konnte jedoch bis jetzt auch mit Hilfe entsprechender Analyseprogramme noch nicht identifiziert werden.

Obwohl diese Daten belegen, dass der N-Terminus als Ganzes essentiell für die Aktivität von Klu zu sein scheint, zeigte sich in der weiteren Analyse, dass große Teile dieses Proteinabschnitts für die Funktion von Klu entbehrlich sind. So konnte bei der Überexpression eines Konstrukts, dem die ersten 400 Aminosäuren fehlten, im Vergleich zur Überexpression des vollständigen Proteins kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung des Borsten- bzw. Beinphänotyps festgestellt werden (Abb. 10). Die Aminosäuren 1-400 werden demnach für die hier analysierte Funktion von Klu nicht benötigt. Da sich dieses Konstrukt von dem zuvor untersuchten C-terminalen Fragment nur durch das Vorhandensein der Aminosäuren 401-583 unterscheidet, ist dies ein deutlicher Hinweis dafür, dass diese Aminosäuren für die Aktivität von Klu erforderlich sind (s.u.). Der in dem Konstrukt deletierte Bereich umfasst auch die bei der Datenbank-

analyse gefundene potentielle coiled coil-Domäne. Dieses Motiv besitzt somit keine Funktion für die untersuchte Aktivität des Klu-Proteins.

### 3.4 Der N-Terminus wird für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt

Die besondere Bedeutung des N-Terminus zeigte sich auch in einem weiteren Experiment, in dem nur der Bereich des Proteins (HA-Klu1-583) mit *kluGal4* überexprimiert wurde. Durch die Überexpression dieses Proteinabschnitts kam es zu einer massiven Störung der normalen Borstenentwicklung. Im Vergleich zum Wildtyp wurde nur noch ein Bruchteil der normalerweise vorhandenen Borsten gebildet. Betroffen waren sowohl Macro- als auch Microchaeten in allen analysierten Bereichen des adulten Fliegenkörpers (Abb. 12). Die weitere Analyse ergab, dass bei einer Überexpression des N-Terminus deutlich weniger SOPs determiniert werden als im Wildtyp. Sie führt damit zu einem entgegengesetzten Phänotyp wie die Überexpression des normalen Proteins. Dieser Phänotyp wurde in dieser Arbeit daher als dominant-negativer Phänotyp bezeichnet. Bemerkenswerterweise ist dieser dominant-negative Phänotyp wesentlich stärker als der Phänotyp, der bei einem Ausfall der Genfunktion von *klu* auftritt. Es muss daher angenommen werden, dass durch die Überexpression des N-Terminus andere, für die Determination der SOPs relevante Proteine in ihrer Funktion negativ beeinflusst werden. Dies ließe sich u.a. dadurch erklären, dass der N-terminale Teil von Klu in der Lage ist, mit diesen Proteinen zu interagieren. Da es sich bei Klu um einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor handelt, ist es durchaus vorstellbar, dass Klu zusammen mit diesen anderen Proteinen einen Komplex bildet, der an der DNA lokalisiert ist und die Expression von Zielgenen reguliert. Bei einer Überexpression des N-terminalen Teils von Klu ist dieser Abschnitt vermutlich noch in der Lage, mit diesen anderen Proteinen zu interagieren, kann aber aufgrund des Verlustes der Zink-Finger nicht mehr an die DNA binden. Dies hätte zur Folge, dass diese, für die Borstenentwicklung essentiellen Proteine, von der DNA wegtitriert würden und sie somit nicht mehr ihre normale Funktion ausüben könnten (s. Abschnitt 3.11). Dementsprechend käme es zu einer Deregulation der Expression der Zielgene und damit zu der beobachteten massiven Störung der Borstenbildung.

Durch die Analyse weiterer Deletionskonstrukte war es möglich, den für die mögliche Interaktion mit anderen Proteinen relevanten Bereich auf die Aminosäuren 400-500 einzugrenzen. So war ein Konstrukt, das die ersten 500 Aminosäuren umfasste (HA-Klu1-500), noch in der Lage, bei einer Überexpression den dominant-negativen Phänotyp herbeizuführen (Abb. 15 A-D). Wurde der N-Terminus jedoch um weitere 100 Aminosäuren im C-terminalen Bereich verkürzt (HA-Klu1-400), hatte die Überexpression diese



Konstrukts nur noch minimale Auswirkungen auf die normale Borstenentwicklung (Abb. 15 E-H). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die ersten 400 Aminosäuren für die Interaktion von Klu mit anderen Proteinen benötigt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass ein für die Funktion von Klu essentieller Bereich zwischen den Aminosäuren 500-583 liegt (s.o.).

Um weitere Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion dieses Proteinabschnitts zu bekommen, wurde die Aminosäuresequenz in einer speziellen Datenbankanalyse auf kurze homologe Bereiche zu anderen Proteinen hin untersucht. Hier zeigte sich, dass der Aminosäureabschnitt 400-500 einige kurze, zu den Spalt-like Proteinen der Vertebraten homologe Sequenzabschnitte enthielt (Abb. 16). In einer weiteren Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Homologien keine Bedeutung für die Funktion von Klu besitzen. So führte die Überexpression eines Klu-Konstrukts, dem diese homologen Bereiche fehlten (HA-Klu $\Delta$ 426-489) zu dem charakteristischen Überexpressionsphänotyp (Abb. 17).

Ein signifikanter Unterschied zur Überexpression des normalen Klu-Proteins konnte weder beim Borsten- noch beim Beinphänotyp festgestellt werden (vgl. Abb. 17 mit 9). Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da alle bisherigen Daten darauf hingewiesen haben, dass der deletierte Bereich für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt wird. Was letztendlich die Gründe für diese gegensätzlichen Ergebnisse sind, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend festgestellt werden. Möglicherweise wurde der deletierte Bereich (426-489) mit gerade mal 63 Aminosäuren zu klein gewählt und hätte mindestens die Aminosäuren 400-500 umfassen sollen. In weiterführenden Arbeiten wäre ein derartiges Konstrukt auf seine Funktionalität hin zu prüfen. Außerdem sollte ein Konstrukt generiert werden, dem sowohl dieser Aminosäureabschnitt als auch der C-terminale Abschnitt mit den Zink-Fingern fehlt. Hier wäre zu testen, ob dieses Konstrukt noch immer in der Lage ist, den dominant-negativen Phänotyp zu erzeugen.

### 3.5 Die Analyse der Zink-Finger-Region

Die bisherigen Ergebnisse der Deletionsanalyse sowie frühere *in vitro*-Experimente (s.o.) deuten darauf hin, dass der C-Terminus des Klu-Proteins für die Bindung an die DNA benötigt wird. Da dieser Proteinabschnitt als einzige strukturelle Komponente die vier Zink-Finger enthält, ist es wahrscheinlich, dass die DNA-Bindung durch die Zink-Finger vermittelt wird. Weitere Hinweise für diese Vermutung lieferte die in dieser Arbeit durchgeführte Deletionsanalyse. In dieser Analyse wurde die Funktionalität von Klu-Varianten untersucht, denen entweder nur ein einzelner oder verschiedene Kombinationen von Zink-Fingern fehlten (Abb. 8 M-P). Hier zeigte sich, dass eine Kombination von drei Zink-

Fingern ausreichend ist, um eine DNA-Bindung des Proteins zu gewährleisten. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um die Zink-Finger 1-3 oder 2-4 handelt. In beiden Fällen führte die Überexpression eines Konstrukts, dem jeweils ein Zink-Finger fehlte (ZF1 oder ZF4) zu dem typischen *klu*-Überexpressionsphänotyp. Ein signifikanter Unterschied zur Überexpression des vollständigen Klu-Proteins war bei keinem der beiden Konstrukte festzustellen (Abb. 18). Das bedeutet, dass diese Konstrukte trotz des Verlustes eines Zink-Fingers voll funktionstüchtig waren. Es konnten auch keine sonstigen Veränderungen festgestellt werden. Dies ist besonders für das Konstrukt, dem der erste Zink-Finger fehlte, ein wichtiges Ergebnis. Wie bereits erwähnt, wird Klu zur Familie der EGR-Transkriptionsfaktoren gezählt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen dieser Familie besitzt Klu genau wie sein nächster Verwandter in der Familie, das WT-1 Protein, vier anstatt nur drei Zink-Finger. Bei beiden Proteinen ist es der erste Zink-Finger, der zusätzlich vorhanden ist und sich in seiner Sequenz etwas von den übrigen Zink-Fingern unterscheidet. Für WT-1 konnte gezeigt werden, dass der zusätzliche erste Zink-Finger nicht nur für die DNA-Bindung, sondern auch für Protein-Protein Interaktionen verwendet wird (Maheswaran et al., 1995). Dass auch bei Klu der erste Zink-Finger an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein könnte, ist aufgrund der bisherigen Ergebnisse und des unveränderten Überexpressionsphänotyps dagegen eher unwahrscheinlich.

Durch die Deletionsanalyse konnte zudem gezeigt werden, dass eine Kombination von nur zwei Zink-Fingern für die Funktion von Klu nicht ausreichend ist. Die Überexpression entsprechender Klu-Varianten, denen entweder die Zink-Finger 1+2 bzw. 3+4 fehlten, führte zur Ausbildung des bereits diskutierten dominant-negativen Phänotyps (Abb. 19). Es kann daher vermutet werden, dass durch den Verlust dieser Zink-Finger das Protein nicht mehr an die DNA binden kann. Die Überexpression dieser Varianten führt daher zu einem vergleichbaren Phänotyp wie die Überexpression des Konstrukts ohne Zink-Finger. Neuere Untersuchungen am WT1-Protein haben gezeigt, dass sich die beiden, für die Bindung an die DNA essentiellen Zink-Finger, an Position 2 und 3 befinden (Reynolds et al., 2003). Wäre dies bei Klu auch der Fall, könnte dadurch erklärt werden, warum weder der Wegfall des ersten noch des vierten Zink-Fingers einen Funktionsverlust zur Folge hatte. Es würde auch erklären, warum die Zink-Finger-Kombinationen 1+2 bzw. 3+4 vermutlich nicht mehr ausreichen, um eine Bindung des Proteins an die DNA zu gewährleisten. Diese theoretischen Überlegungen sollten mit Hilfe weiterer Deletionskonstrukte untersucht werden. Es wäre z.B. interessant zu wissen, wie die Funktionalität eines Konstrukts ist, dem nur der zweite oder nur der dritte Zink-Finger fehlt. Zudem sollte untersucht werden, wie sich eine Variante verhält, die nur noch die für WT-1 essentiellen Zink-Finger 2+3 enthält.

Ein weiteres Ergebnis, das es in diesem Zusammenhang zu diskutieren gilt, ist die Beobachtung, dass bei der Überexpression einer Variante von Klu, bei der ein HA-Epitop an den C-Terminus des vollständigen Proteins fusioniert wurde, der dominant-negative Phänotyp ausgebildet wird (Abb. 20). Vermutlich wird durch die Fusion mit dem HA-Epitop der C-Terminus derart verändert, dass er nicht mehr an die DNA binden kann.

### 3.6 Klu fördert als Repressor die Determination der SOPs

Ein wichtiger Beitrag für das Verständnis der Funktionsweise von Klu ist die Beantwortung der Frage, ob Klu als Aktivator oder Repressor der Transkription wirkt. Anhand der aus den Überexpressionsstudien gewonnenen Daten wurde zunächst vermutet, dass Klu ein Transkriptionsaktivator ist, der die Expression von Genen reguliert, welche die Determination der SOPs fördern. Diese Annahme konnte jedoch im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr konnte in einer Funktionsanalyse mit Hilfe von Fusionsproteinen gezeigt werden, dass Klu wahrscheinlich als Repressor wirkt.

Für die Funktionsanalyse wurden rekombinante Proteine hergestellt, bei denen entweder die VP16-Aktivator-domäne aus dem *herpes simplex*-Virus oder die en-Repressordomäne aus *Drosophila* an den DNA-bindenden, C-terminalen Teil von Klu fusioniert wurde. Auf diese Weise wurden Varianten von Klu hergestellt, die als konstitutiv aktiver Aktivator bzw. Repressor agieren und gleichzeitig an die Zielgene von Klu binden können.

Wäre Klu, wie zunächst vermutet, tatsächlich ein Aktivator der Transkription, hätte man erwartet, dass die Überexpression von *klu* bzw. des VP16-Fusionsproteins (HA-VP16-*klu*<sup>ΔN</sup>) zu vergleichbaren Phänotypen führt. Dies war jedoch nicht der Fall. Vielmehr wurde durch eine Überexpression von HA-VP16-*klu*<sup>ΔN</sup> die Determination von SOPs verhindert (Abb. 21 E-G). Dementsprechend kam es in adulten Individuen zu einem starken Verlust von Borsten, ähnlich dem, der auch bei der Überexpression der dominant-negativen Varianten zu beobachten war (Abb. 21 B-D). Die gegensätzlichen Phänotypen der Überexpression von *klu* bzw. HA-VP16-*klu*<sup>ΔN</sup> legen nahe, dass Klu kein Transkriptionsaktivator, sondern ein Repressor ist.

Bestätigt werden konnte diese Annahme durch die Analyse des zweiten Fusionsproteins. Die Überexpression der Klu-Variante mit der Repressordomäne (HA-en-*klu*<sup>ΔN</sup>) führte zur Bildung vieler zusätzlicher und ektopischer Borsten und damit zu einem fast identischen Phänotyp wie die Überexpression von UAS-*klu* (Abb. 22). Es muss daher angenommen werden, dass das Repressorfusionsprotein HA-en-*klu*<sup>ΔN</sup> und Klu in gleicher Weise wirken. Bestätigt werden konnte diese Annahme durch einen weiteren Versuch, in dem beide Konstrukte in Flügelimaginalscheiben konstitutiv in Klonen überexprimiert wurden. Bei beiden Konstrukten führte die klonale Überexpression zur Bildung zahlreicher ektopischer

SOPs (Abb. 23). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Repressorfusionsprotein HA-en-klu<sup>ΔN</sup> genau wie Klu die Fähigkeit besitzt, bei einer Überexpression die Determination von SOPs und damit die Transformation ektodermaler Vorläuferzellen in Zellen mit einem neuronalen Entwicklungsschicksal zu fördern. Ein weiterer wichtiger Punkt bei diesem Experiment war die Beobachtung, dass HA-en-klu<sup>ΔN</sup> genau wie Klu in der Lage war, ektopische SOPs auch außerhalb der Flügelanlage, z.B. im Bereich des Notums, zu induzieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass beide Konstrukte in qualitativ gleicher Weise agieren. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Beobachtung, dass die Überexpression von UAS-*klu* bzw. HA-VP16-klu<sup>ΔN</sup> zu gegensätzlichen Phänotypen führte, muss davon ausgegangen werden, dass Klu entgegen den Erwartungen nicht als Aktivator, sondern als Repressor der Transkription fungiert.

Allerdings scheint es bei Klu und dem Repressorfusionsprotein HA-en-klu<sup>ΔN</sup> einen Unterschied in der Stärke ihrer Wirkungsweise zu geben. Dies zeigte sich vor allem bei der klonalen Überexpressionsanalyse. Zwar waren beiden Konstrukte in der Lage, die Bildung vieler ektopischer SOPs zu induzieren, jedoch war die Anzahl bei HA-en-klu<sup>ΔN</sup> stets etwas höher als bei Klu. Die Vermutung, dass die Expression von UAS-HA-en-klu<sup>ΔN</sup> einen besonders starken Phänotyp verursacht, würde auch erklären, warum die Überexpression dieses Konstrukts mit *kluGal4* zur embryonalen Letalität führt. Eine entsprechende Letalität tritt auch bei der Expression besonders starker UAS-*klu*-Linien auf. Der Unterschied in der Stärke ihrer Wirkungsweise lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass HA-en-klu<sup>ΔN</sup> im Gegensatz zu Klu nur aus den Zink-Fingern plus der Repressordomäne besteht. Es ist daher davon auszugehen, dass dieses Konstrukt konstitutiv aktiv ist und im Gegensatz zu Klu nicht von anderen Proteinen abhängig ist, bzw. nicht den endogenen Regulationsmechanismen unterliegt.

### **3.7 Die Überexpression von *klu* hat weder einen Einfluss auf die Notch-Aktivität noch auf die Expression der Zielgene des Notch-Signalwegs**

Interessanterweise entwickelten sich bei der klonalen Expression von *klu* bzw. HA-en-klu<sup>ΔN</sup> sehr viele Zellen eines Klons zu SOPs. Für HA-en-klu<sup>ΔN</sup> konnte sogar gezeigt werden, dass in manchen Klonen alle Zellen das neuronale Zellschicksal annehmen (Abb. 23 E,F). Ein derartiger Phänotyp ist bisher noch nicht beschrieben worden und kann auch durch die klonale Expression eines proneuralen Gens nicht induziert werden (Abb. 23 G-J). Umso interessanter ist die Frage, wie durch die Überexpression eines Repressors ein derartiger Phänotyp hervorgerufen werden kann. Die Tatsache, dass sich unmittelbar benachbarte Zellen zu SOPs entwickeln deutet darauf hin, dass durch die Expression des Klu-Repressors die laterale Inhibition massiv gestört wird. Durch den Prozess der lateralen

Inhibition wird normalerweise die Anzahl der gebildeten SOPs in einem proneuralen Cluster auf eine bzw. einige wenige beschränkt. (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Campuzano und Modolell, 1992).

Da der Notch-Signalweg im Prozess der lateralen Inhibition eine Schlüsselrolle einnimmt, ist es durchaus denkbar, dass durch die Überexpression von *klu*, bzw. des Fusionsproteins, die Aktivität des Notch-Signalwegs vermindert wird. Diese Vermutung wurde zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass durch eine Co-Expression von UAS-*klu* und UAS-*N* der bei einer Expression von UAS-*N* zu beobachtende Verlust von Borsten unterdrückt werden konnte (Abb. 31 A-H). Die Analyse der Notch-Aktivität mit Hilfe eines speziellen Reporterkonstrukts (*Gbe* + *Su(H)<sub>m8</sub>*) zeigte jedoch, dass die Überexpression von *klu* mit *kluGal4* zu keiner offensichtlichen Änderung der Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe führt (Abb. 31 I-L). *Klu* scheint demnach keinen direkten Einfluss auf die Aktivität des Notch-Signalwegs zu haben. Eine weitere Möglichkeit wie *Klu* einen Einfluss auf den Notch-Signalweg nehmen könnte, ohne die Aktivität des Signalwegs direkt zu beeinflussen, besteht in der Regulation der Expression der Notch-Zielgene. Im Zusammenhang mit der SOP-Entwicklung sind das vor allem die Gene des *E(spl)*-K. Eine wichtige Rolle bei der Determination bzw. Selektion der SOPs spielt insbesondere das Gen *E(spl)m8*, das dementsprechend auch in allen proneuralen Clustern expremiert wird (Bailey und Posakony, 1995; de Celis et al., 1996; Singson et al., 1994). Die Analyse der *E(spl)m8*-Expression mit Hilfe eines lacZ-Reporterkonstrukts (*m8-lacZ*) zeigte jedoch, dass es bei einer Überexpression von *klu* mit *kluGal4* zu keiner Änderung im Expressionsmuster bzw. in der Expressionsstärke des Reporterkonstrukts kommt (Abb. 31 M-P).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass *Klu* vermutlich nicht über den Notch-Signalweg wirkt. Durch eine Überexpression von *klu* werden weder die Aktivität des Signalwegs noch die Expression des für die SOP-Bildung wichtigen Zielgens von Notch beeinflusst bzw. reprimiert. Die Beobachtung, dass UAS-*klu* bei einer Co-Expression mit UAS-*N* den von UAS-*N* beobachteten Verlust der Borsten verhindern kann, lässt sich z.B. dadurch erklären, dass durch die Überexpression von *klu* eine andere, SOP-fördernde Aktivität in der Zelle erhöht wird (s.u.). Diese Aktivitätssteigerung reicht aus, um die erhöhten Notch-Konzentrationen und die dadurch gesteigerte Aktivität des Signalwegs zu kompensieren bzw. die Zelle gegenüber dieser erhöhten Notch-Aktivität zu desensibilisieren.

### 3.8 *klu* ist kein proneurales Gen und stark aber nicht absolut von der Aktivität der proneuralen Gene abhängig

Wie bereits beschrieben, führt eine Erhöhung der Klu-Aktivität zu einer verstärkten SOP-Bildung und dementsprechend zu mehr Borsten. Ein vergleichbarer Phänotyp ist für die Überexpression der beiden proneuralen Gene *ac* und *sc* beschrieben worden (Rodrigues et al., 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von UAS-*klu* bzw. UAS-*sc* mit *kluGal4* zu nahezu identischen Borstenphänotypen führt (Abb. 5). Daher stellt sich die Frage, in welcher funktionellen Beziehung *klu* zu den proneuralen Genen steht. Eine Antwort darauf könnte sein, dass *klu* selbst ein neuartiges proneurales Gen ist, welches unabhängig von den anderen die SOP-Bildung induzieren kann. Dagegen sprechen jedoch zwei Beobachtungen. Erstens unterscheidet sich Klu strukturell deutlich von allen anderen bisher bekannten proneuralen Faktoren, da es keine bHLH-Domäne, sondern eine Zink-Finger-Domäne besitzt. Zweitens ist die Aktivität von Klu stark von der Gegenwart funktionaler proneuraler Gene abhängig. Wenn die Genfunktionen von *ac* und *sc* fehlen, kann eine Überexpression von Klu nur sehr bedingt die Bildung von Borsten induzieren. Dies zeigte sich z.B. bei der Überexpression von UAS-*klu* bzw. UAS-*sc* mit *kluGal4* in Tieren, die hemizygot für die Defizienz *Df(1)sc<sup>10.1</sup>* waren (Abb. 24). Da diesen Tieren die Funktion der Gene *ac* und *sc* fehlt, bilden sie keine Borsten im Bereich des Thorax und des Kopfes aus. Dieser Phänotyp konnte durch eine Expression von UAS-*sc* mit *kluGal4* gerettet werden (Abb. 24 C). Eine vergleichbare Rettung war bei einer Überexpression von UAS-*klu* dagegen nicht festzustellen (Abb. 24 B). Klu ist demnach nicht in der Lage, die proneuralen Gene *ac* und *sc* funktional zu ersetzen. Ihm fehlt damit ein typisches Merkmal aller proneuralen Gene, die untereinander ein hohes Maß an funktioneller Redundanz zeigen. Daraus lässt sich schließen, dass *klu* selber kein proneurales Gen ist und dass es vermutlich nicht unabhängig von den proneuralen Genen die Bildung von Borsten induzieren kann.

Obwohl Klu die proneuralen Gene *ac* und *sc* nicht ersetzen kann, bildeten sich auf dem Thorax der *ac*- und *sc*-defizienten Fliege auch bei der Überexpression von *klu* vereinzelte kurze Borsten (Abb. 24 B). Diese Tatsache führt zu der Frage, wie *klu* die Bildung dieser Borsten induzieren kann, wenn seine Aktivität eigentlich von *ac* und *sc* abhängig ist. Ein Erklärungsansatz beruht auf der Beobachtung, dass selbst in *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren noch vereinzelte Borsten gebildet werden (Abb. 24 D). Dies deutet darauf hin, dass trotz des Fehlens von *ac* und *sc* noch eine proneurale Restaktivität vorhanden sein muss, die durch andere, möglicherweise noch unbekannte Gene kodiert wird. Eventuell wird bei einer Überexpression von *klu* diese proneurale Restaktivität derart verstärkt, dass sie ausreicht, die Bildung zusätzlicher Borsten zu induzieren. Dadurch ließe sich auch erklären, weshalb an Stellen, an denen in den *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren noch einzelne Borsten vorkommen, bei

einer Überexpression von *klu* deutlich mehr Borsten gebildet werden (z.B. am Bein, vgl. Abb. 24 D und E).

Einen weiteren Hinweis darauf, dass *klu* auch mit anderen proneuralen Genen als *ac* und *sc* interagieren kann, lieferte der Phänotyp, der bei einer Überexpression von *klu* im dritten Segment der Antenne zu beobachten ist. In diesem Segment kommen normalerweise keine mechanosensorischen Borsten, sondern lediglich die Sensillen des olfaktorischen Systems vor. Die Entwicklung der Sensillen ist von der Aktivität der beiden proneuralen Gene *amos* und *atonal* abhängig (Goulding et al., 2000; Gupta und Rodrigues, 1997). Bei einer Überexpression von *klu* kommt es hier jedoch zur Ausbildung ektoptischer mechanosensorischer Borsten, die anstelle der olfaktorischen Sensillen gebildet werden (Abb. 5 H). Ein identischer Phänotyp zeigte sich auch bei der Überexpression von *klu* in *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren (Abb. 24 G). Der Ausfall der Genfunktion von *ac/sc* hatte demnach keine Auswirkungen auf die Ausprägung dieses spezifischen Überexpressionsphänotyps. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass *klu* nicht nur zusammen mit *ac* und *sc*, sondern auch mit den proneuralen Genen *amos* und/oder *atonal* interagieren und die Bildung von Borsten induzieren kann. Da bei einer Überexpression von *klu* anstelle von Sensillen des olfaktorischen Systems Borstensinnesorgane gebildet wurden, ist davon auszugehen, dass Klu nicht nur die Bildung von Sinnesorganen induzieren kann, sondern auch an der Bestimmung der Identität der Sinnesorgane beteiligt ist.

Bisher konnte gezeigt werden, dass *klu* kein proneurales Gen im eigentlichen Sinne ist und seine Aktivität weitgehend von den proneuralen Genen abhängig ist. Dennoch kann eine geringe proneurale Aktivität von Klu nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Diese könnte ausreichen, um bei einer Überexpression in einem *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Hintergrund die Bildung vereinzelter Borsten zu induzieren. Einen weiteren Hinweis für diese Annahme lieferte ein Experiment, in dem *klu* mit Hilfe des MARCM Systems in Klonen überexprimiert wurde, die gleichzeitig mutant für die Genfunktion von *da* waren. Da angenommen wird, dass *Da* als Dimerisierungspartner für die Aktivität aller proneuralen Gene benötigt wird (Cabrera und Alonso, 1991; Van Doren et al., 1991), sollte ein Ausfall der *da*-Funktion den Verlust sämtlicher proneuraler Aktivität bewirken. Wäre die Klu-Funktion vollständig von der Aktivität der proneuralen Gene abhängig, würde erwartet, dass auch bei einer Überexpression von *klu* keine SOPs mehr in *da*-mutanten Klonen gebildet werden. Dies war in den meisten der analysierten Klone auch der Fall. Es wurden jedoch zusätzlich Klone gefunden, in denen trotz des Ausfalls jeglicher proneuraler Aktivität ektoptische SOPs gebildet wurden. Dies galt sowohl für die klonale Überexpression von *klu* (Abb. 25 G-J), als auch für die Überexpression des in seiner Funktion etwas stärker eingeschätzten Klu-Repressorfusionskonstrukts HA-en-Klu<sup>AN</sup> (Abb. 24 K-N). Das weist darauf hin, dass Klu anscheinend in einem geringen Maße das

neuronalen Schicksal (SOP-Schicksal) auch in Abwesenheit jeglicher bekannter proneuraler Aktivität induzieren kann. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, warum sich in *Df(1)sc<sup>10.1</sup>*-Tieren bei einer Überexpression von *klu* Borsten bilden können. Allerdings muss bei der klonalen Analyse berücksichtigt werden, dass bei der Induktion des Klons im ersten Larvenstadium in der Gründerzelle noch Da-Protein bzw. RNA vorhanden war. Möglicherweise sind die Protein/RNA Mengen groß bzw. stabil genug, um bei den nachfolgenden Zellteilungen auf die Tochterzellen des Klons verteilt zu werden („perdurance“). Es kann demnach nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass in manchen Zellen der Klone im dritten Larvenstadium, auch nach einigen Zellteilungen, noch geringfügige Reste an Da-Protein vorhanden waren. Unter Umständen reicht die dadurch bedingte proneurale Aktivität aus, um bei einer starken und anhaltenden Expression von *klu* in einigen Zellen das SOP Schicksal zu induzieren.

Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass *Klu* tatsächlich unabhängig von *Da* und damit von jeglicher bekannten proneuralen Aktivität das neuronale Schicksal induzieren kann. Dieses Ergebnis wäre von weitreichender Bedeutung, da der gegenwärtige Stand der Forschung davon ausgeht, dass bei *Drosophila* die Entwicklung des PNS ausschließlich von den proneuralen Genen initiiert werden kann. Wenn *Klu* in der Lage wäre, das neuronale Schicksal (SOP-Schicksal) in einem geringen Maße auch ohne die proneuralen Gene zu induzieren, wäre denkbar, dass die Neurogenese durch einen bisher unentdeckten Reaktionsweg unabhängig von den bekannten proneuralen Genen initiiert werden könnte. Hinweise darauf, dass die proneuralen Gene nicht unbedingt notwendig für die Initiation der Neurogenese sind, kommen von der Neurogenese bei den Vertebraten. Hier werden, im Gegensatz zu dem postulierten Modell bei *Drosophila*, die proneuralen Gene nicht für die Initiation der Neurogenese, sondern für die Aufrechterhaltung des neurogenen Schicksals benötigt (Bertrand et al., 2002; Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1997). Ob es in *Drosophila* tatsächlich einen zu den Vertebraten vergleichbaren Reaktionsweg gibt und welche Rolle *Klu* in diesem Reaktionsweg spielen könnte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

### **3.9 Die Überexpression von *klu* erhöht die proneurale Aktivität**

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass *Klu*, wenn auch nicht absolut, zumindest in einem hohen Maß von der Aktivität der proneuralen Gene abhängig ist. Es muss daher angenommen werden, dass *Klu* primär mit den bzw. über die proneuralen Gene das neuronale Zellschicksal induziert. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass bei einer Überexpression von *klu* die Expression von *sca*, einem direkten Zielgen von *Ac* und *Sc*, erhöht wird. So zeigte sich bei der Analyse der Expression eines *sca-lacZ*-Reporterkonstrukts in Flügelimaginalscheiben des



dritten Larvenstadiums, dass die Überexpression von UAS-*klu* mit *kluGal4* zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der *sca-lacZ*-exprimierenden Zellen führte (Abb. 26). Dieses Ergebnis kann in zwei Richtungen interpretiert werden: Zum einen könnte es bedeuten, dass Klu die Expression der proneuralen Gene direkt reguliert. Die Folge wäre, dass bei einer Überexpression von *klu* auch die Expression von *ac* und *sc* erhöht würde. Dementsprechend käme es zu einer stärkeren Aktivierung der Zielgene. Es ist aber auch denkbar, dass die Überexpression von *klu* nur die Aktivität von Ac und Sc erhöht, indem sie die Fähigkeit der beiden Faktoren steigert, ihre Zielgene zu aktivieren bzw. indem sie die Sensitivität der Zellen gegenüber der gegebenen proneuralen Aktivität erhöht. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sprechen für die zweite Variante, die davon ausgeht, dass Klu die Aktivität von Ac und Sc reguliert, ohne die Expression der beiden Gene direkt zu beeinflussen. Gezeigt werden konnte dies z.B. durch eine Antikörperfärbung gegen Ac. Die Überexpression von *klu* hatte keinen offensichtlichen Einfluss auf die Expression bzw. die nachweisbaren Proteinmengen dieses proneuralen Faktors (Abb. 27). Es konnte weder eine Verbreiterung der bestehenden Expressionsdomänen beobachtet werden, noch führte die Überexpression von *klu* zu einer ektopischen Aktivierung der *ac*-Expression. Zudem zeigte sich in einem weiteren Experiment, dass durch die Überexpression von *klu* auch die Expression des *DC-lacZ*-Reporterkonstrukts nicht beeinflusst wird. Dieser Reporter enthält ein Enhancer-Element aus der genomischen Region des *AS-K*, das ausschließlich die allgemeine Expression von *ac/sc* im dorsozentralen Cluster aktiviert. Hätte Klu einen direkten Einfluss auf die *ac/sc*-Expression, würde man erwarten, dass bei einer Überexpression von *klu* dieses Reporterkonstrukt stärker bzw. ektopisch aktiviert würde. Dies war jedoch weder bei einer Überexpression mit *kluGal4* noch bei einer ektopischen Expression von *klu* in Klonen der Fall (Abb. 29). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass Klu die SOP-Bildung vermutlich nicht durch eine direkte Aktivierung der Expression von *ac* und *sc* fördert.

Allerdings ergab die Analyse eines weiteren *lacZ*-Reporterkonstrukts, das ein 3,7 kb Fragment des *sc*-Promotors enthielt, ein zu den bisherigen Ergebnissen konträres Bild. Dieses Promoterfragment aktiviert die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase normalerweise in dem Bereich der proneuralen Cluster TSM und L3 im dorsalen Teil der Flügeltasche sowie in den sich entwickelnden SOPs (Abb. 28 A) (Culi und Modolell, 1998). Es enthält demnach u.a. den für die Expression von *ac* und *sc* in den SOPs relevanten SOP-Enhancer. Die Überexpression von *klu* führte dementsprechend zu einer starken Aktivierung des Reporters insbesondere in den Bereichen, in denen sich ektopische SOPs bildeten. Allerdings war die Expression nicht auf die SOPs beschränkt, sondern konnte auch in angrenzenden Zellen nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl bei einer Überexpression von *klu* mit *kluGal4* und *dppGal4*, als auch bei der klonalen Expression

von *klu* beobachtet werden (Abb. 28 B-L). Dieses Ergebnis deutet zunächst darauf hin, dass *Klu* möglicherweise doch einen direkten Einfluss auf die generelle Expression von *ac/sc* haben könnte. Allerdings beinhaltet das verwendete Reporterkonstrukt nicht den gesamten Promoter von *sc*. Da solche verkürzten Promoterfragmente oft nicht die endogene Expression widerspiegeln, ist die Aussagekraft dieses Experiments jedoch in Frage zu stellen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Aktivierung des Reporters allein auf die Aktivität des SOP-Enhancers zurückzuführen ist. Dieser ist selbst ein Zielgen der proneuralen Gene, und in seine Aktivität direkt von der proneuralen Aktivität abhängig. Es wäre daher denkbar, dass die durch die Überexpression von *klu* induzierte Erhöhung der proneuralen Aktivität zu einer allgemeinen ektopischen Aktivierung des Enhancers und damit des *sc-lacZ*-Reporters führt.

Diese Theorie konnte durch ein weiteres Experiment gestützt werden, in dem gezeigt wurde, dass die Überexpression von *klu* de facto zu einer starken Aktivierung des SOP-Enhancers führt. In diesem Experiment wurde die Expression eines künstlichen SOP-Enhancers (*OC10-lacZ*) untersucht. Dieser Enhancer enthielt alle für eine spezifische Expression in der SOP benötigten regulatorischen Elemente (Culi und Modolell, 1998). Sowohl die Expression von *UAS-GFP-klu* mit *kluGal4* als auch die klonale Überexpression führten zu einer starken Aktivierung des künstlichen SOP-Enhancers in allen gebildeten SOPs (Abb. 30).

Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass es bei einer Überexpression von *klu* zu einer Erhöhung der proneuralen Aktivität kommt, die ausreichend ist, um in einigen Zellen den SOP-Enhancer ektopisch zu aktivieren. Diese durch *klu* induzierte Aktivitätserhöhung beruht jedoch vermutlich nicht auf einer Erhöhung der Expressionsstärke der proneuralen Gene.

### 3.10 *Klu* supprimiert die Expression von *emc*

Eine Antwort auf die Frage, wie *Klu* die proneurale Aktivität erhöhen kann, ohne die Expression der proneuralen Gene direkt zu beeinflussen, könnte sein, dass *Klu* als Repressor die Expression von Antagonisten der proneuralen Faktoren reguliert. Ein bekannter Antagonist proneuraler Aktivität ist der Notch-Signalweg. Wie bereits in Abschnitt 3.7 diskutiert, wird dieser Signalweg durch *Klu* jedoch weder in seiner Aktivität noch in der Expression der Zielgene beeinflusst.

Ein weiterer bekannter Gegenspieler der proneuralen Faktoren ist *Emc*. *Emc* ist in der Lage, inaktive Heterodimere mit den proneuralen Faktoren zu bilden und auf diese Weise die proneurale Aktivität zu reduzieren (Cabrera et al., 1994; Van Doren et al., 1991). Eine Suppression der *emc*-Expression führt zu einer Erhöhung der proneuralen Aktivität und könnte somit eine Erklärung für die Wirkungsweise von *Klu* sein. *Emc* wird normalerweise

ubiquitär in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Allerdings gibt es Unterschiede in der Expressionsstärke der verschiedenen Bereiche der Scheibe, mit Tälern der Expression im Bereich der proneuralen Cluster und Bereichen höherer Expression außerhalb der *ac/sc*-Expressionsdomänen. Zudem wird die *emc*-Expression in den SOPs nach ihrer Determination ausgeschaltet (Campuzano, 2001; Cubas und Modolell, 1992). Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Überexpression von *klu* die Expressionsstärke von *emc* herabgesetzt wird. In den analysierten Flügelimaginalscheiben war eine deutliche Verminderung der *emc*-Expression aber nur bei der klonalen Überexpression von *klu* zu beobachten. Eine Antikörperfärbung gegen das Emc-Protein zeigte, dass im Vergleich zu den angrenzenden wildtypischen Zellen, alle Zellen der analysierten Klone eine deutlich verminderte *emc*-Expression aufwiesen (Abb. 32 K-P). Dabei ist zu beachten, dass in den Klonen die *emc*-Expression sowohl in den SOPs, als auch in Zellen vermindert wurde, die keine SOP-spezifische Antikörperfärbung aufwiesen. Die verminderte *emc*-Expression beruht demnach nicht darauf, dass sich alle Zellen innerhalb des Klons zu SOPs entwickelt haben, sondern scheint unmittelbar durch die Überexpression von *klu* induziert zu werden. Es wäre jedoch denkbar, dass die verringerte *emc*-Expression nur ein indirekter Effekt der *klu*-Expression ist, der darauf beruht, dass durch eine Überexpression von *klu* die proneurale Aktivität erhöht wird. Dies konnte jedoch durch eine klonale Überexpression von UAS-*sc* ausgeschlossen werden. Die alleinige Erhöhung der proneuralen Aktivität hatte keinen Einfluss auf die Expression von *emc* (Abb. 32 Q-T). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die bei der klonalen Überexpression von *klu* nachgewiesene Verringerung der *emc*-Expression für Klu spezifisch ist und unmittelbar von der Aktivität von Klu abzuhängen scheint.

Es stellt sich gleichwohl die Frage, warum bei einer Überexpression von *klu* mit *kluGal4* keine signifikante Änderung der *emc*-Expression zu beobachten war (Abb. 32 E-J). Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der geringen Sensitivität der durchgeführten anti-Emc-Antikörperfärbung. Diese zeigte sich insbesondere bei der Färbung der wildtypischen Scheibe. Wie in Abb. 32 A-D gezeigt, wird *emc* ubiquitär in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Allerdings konnten die in der Literatur berichteten Unterschiede in der Expressionsstärke von *emc* in den verschiedenen Bereichen der Scheibe nicht detektiert werden. Eine Verminderung der *emc*-Expression konnte nur in einzelnen SOPs nachgewiesen werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die eingesetzte Antikörperkonzentration zu hoch war, um die bei einer Überexpression von *klu* mit *kluGal4* zu erwartende großflächige aber geringfügige Verminderung der *emc*-Expression nachweisen zu können. Nur die hohe und anhaltende Expression von *klu* in den Klonen war vermutlich ausreichend, um die *emc*-Expression derart zu verringern, dass sie durch

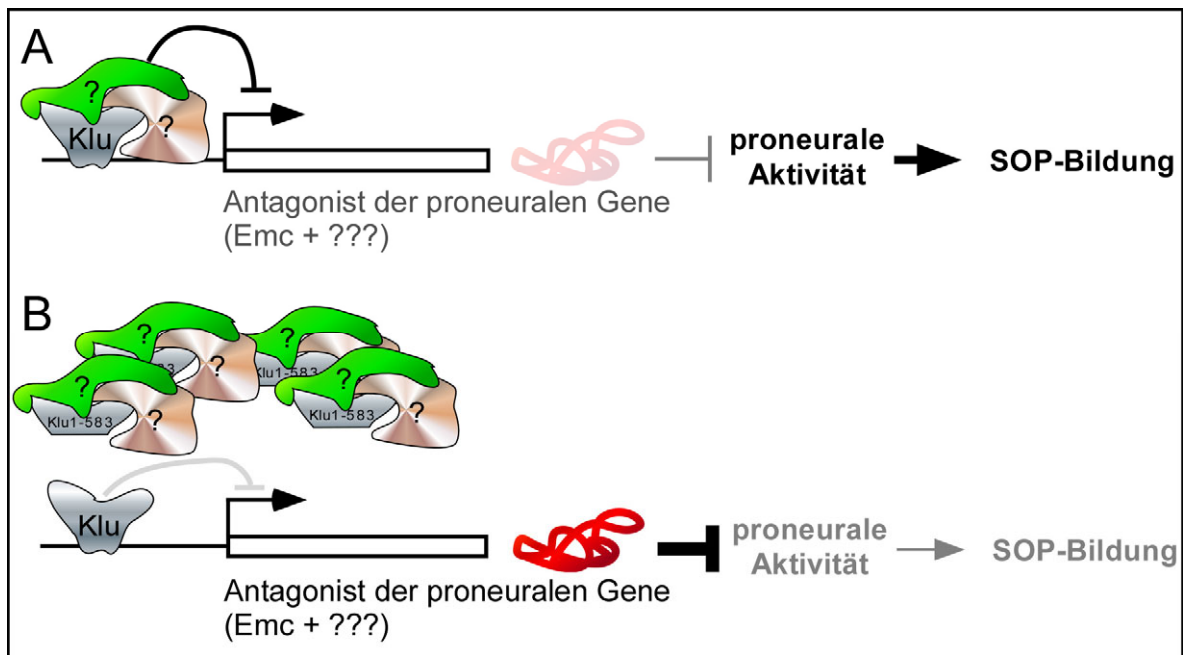
die Färbung eindeutig nachgewiesen werden konnte. Um dies abschließend zu klären, sollten die Versuche mit niedrigeren Antikörperkonzentrationen wiederholt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass *Emc* nicht der einzige Faktor sein kann, dessen Expression durch *Klu* reguliert wird. Es wird angenommen, dass *Emc* nur während der larvalen Entwicklungsstadien aktiv ist und nur eine Funktion bei der Determination der SOPs der Macrochaeten besitzt. *Klu* ist jedoch nachweislich an der Determination der SOPs beider Borstentypen, Macro- und Micochaeten, beteiligt (Abb. 5). Es ist demnach sowohl im Larvenstadium als auch während der pupalen Phase an der Regulation der proneuralen Aktivität beteiligt. Das bedeutet, dass es neben *Emc* noch weitere Faktoren geben muss, die eine Funktion bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems von *Drosophila* besitzen und deren Expression durch *Klu* reguliert wird. Welche Faktoren das sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Diese Frage ist aber ein wichtiger Ansatzpunkt für das Verständnis der Funktionsweise von *Klu* und sollte daher in weiterführenden Arbeiten beantwortet werden (s. Abschnitt. 3.12).

### 3.11 Ein Modell für die *Klu*-Funktion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *klu* an einem Entscheidungsprozess beteiligt ist, der festlegt, ob sich eine Zelle zu einer neuronalen Vorläuferzelle (SOP) entwickelt oder ob diese Zelle ein ektodermales Schicksal annimmt. Das in Abb. 33 gezeigte Modell für die Funktionsweise von *Klu* geht davon aus, dass *Klu* Teil eines Repressorkomplexes ist, der die Expression mehrerer Gene supprimiert. Diese Gene kodieren für Antagonisten bzw. Repressoren der neuronalen Entwicklung. Es handelt sich also um einen doppelt-negativen Regulationsmechanismus der letztendlich die Aktivität der proneuralen Gene verstärkt und dadurch den Zellen ermöglicht, das neuronale Schicksal einzuschlagen. Die Expression von *klu* hat somit einen direkten Einfluss auf die in einer Zelle vorhandene Konzentration proneuraler Antagonisten und damit auf die vorhandene proneurale Aktivität. Eine starke *klu*-Expression bedeutet eine niedrige Konzentration der Antagonisten. Dementsprechend kommt es in diesen Zellen bei einer gleich bleibenden Konzentration von *Ac* und *Sc* zu einer Erhöhung der proneuralen Aktivität. Eine niedrige Expression von *klu* hat dagegen eine hohe Konzentration von Gegenspielern der proneuralen Faktoren zur Folge, die zu einer Verringerung der proneuralen Aktivität führt. Die Expressionsstärke von *klu* definiert demnach wahrscheinlich einen Schwellenwert für die proneurale Aktivität, der überschritten werden muss, damit eine Zelle das neuronale Schicksal annehmen kann.

In diesem Komplex interagiert *Klu* vermutlich über seinen N-Terminus mit anderen Proteinen, die ebenfalls eine wichtige Funktion für die Aktivität des Komplexes besitzen.



**Abb. 33: Modell der Klu Funktion**

(A) Klu ist Teil eines Repressorkomplexes der die Expression von Genen reguliert, die für Antagonisten der proneuralen Gene kodieren. Durch diesen doppelt negativen Regulationsmechanismus wird die Aktivität der proneuralen Gene verstärkt und den Zellen ermöglicht, das neuronale Schicksal einzuschlagen. Die Aktivität dieses Komplexes definiert demnach einen Schwellenwert für die proneurale Aktivität, der überschritten werden muss, damit eine Zelle das neuronale Schicksal annehmen kann. Einer dieser Antagonisten, der durch den Komplex reguliert wird, ist vermutlich Emc. (B) Modell für die Entstehung des dominant-negativen Phänotyps. Wird der N-Terminus von Klu (As. 1-583) überexprimiert, bildet sich vermutlich ein Komplex, der nicht oder nur noch schwach an die DNA binden kann. Die Interaktionspartner von Klu werden dadurch in einem nicht-funktionalen Komplex gebunden und können nicht mehr ihre eigentliche Funktion wahrnehmen. Dies führt zu einer starken Derepression der proneuralen Antagonisten und einer entsprechend starken Verringerung der proneuralen Aktivität. Die Folge davon ist, dass weniger SOPs und dementsprechend weniger Borsten gebildet werden.

Anhand dieses Modells ist es möglich, die verschiedenen, in den Experimenten nachgewiesenen Borstenphänotypen zu erklären. Eine Überexpression von *klu* hätte z.B. zur Folge, dass sich dieser Repressorkomplex entweder effektiver bilden kann oder aber mit einer geringeren Dissoziationsrate an die DNA bindet. Aufgrund dessen führt die Überexpression von *klu* zu einer stärkeren Suppression der proneuralen Antagonisten. Dementsprechend kommt es zu einer Erhöhung der proneuralen Aktivität, was die Bildung zusätzlicher bzw. ektopischer SOPs induziert. In *klu*-Mutanten fehlt dagegen die Funktion von Klu. Aufgrund des relativ schwachen Borstenphänotyps ist davon auszugehen, dass die restlichen Proteine des Komplexes auch ohne Klu in der Lage sind, die Suppression der Antagonisten aufrecht zu erhalten. Allerdings scheint diese Suppression weniger effektiv zu sein. Demzufolge kommt es zu einer leichten Erhöhung in der Konzentration der gebildeten Antagonisten. Die dadurch bedingte leichte Verringerung der proneuralen Aktivität führt dann zu dem nachweisbaren Verlust einiger Borsten. Der dominant-negative Phänotyp lässt sich anhand dieses Modells folgendermaßen erklären: Bei einer Über-

expression des N-Terminus von Klu ist dieser Teil des Proteins immer noch in der Lage, an seine Interaktionspartner zu binden. Es bildet sich vermutlich ein Komplex, der aufgrund des Fehlens der Zink-Finger von Klu, nicht oder nur noch schwach an die DNA binden kann. und daher nur noch eine geringe Aktivität besitzt. Die Interaktionspartner von Klu werden demzufolge in einem nicht-funktionalen Komplex gebunden und können nicht mehr ihre eigentliche Aufgabe wahrnehmen. Dies führt zu einer starken Derepression der proneuralen Antagonisten und einer entsprechend starken Verringerung der proneuralen Aktivität (Abb. 33 B). Die Folge ist, dass deutlich weniger SOPs determiniert werden und sich dementsprechend weniger Borsten bilden.

Ein ähnlich starker Verlust von Borsten wurde bei der Überexpression des konstitutiven Aktivatoronstrukts HA-VP16klu<sup>AN</sup> beobachtet. Da dieses Konstrukt die Zink-Finger-Domäne von Klu besitzt, bindet es an die gleichen Zielgene und führt zu einer Aktivierung der Expression. Dementsprechend sollte eine Überexpression von HA-VP16klu<sup>DN</sup> eine deutliche Erhöhung der Konzentration an proneuralen Antagonisten bewirken. Die daraus resultierende stark verringerte proneurale Aktivität führt zu dem nachgewiesenen starken Verlust von Borsten.

Im Gegensatz dazu bewirkt die Überexpression des konstitutiven Repressors HA-enklu<sup>AN</sup>, dass die Zielgene von Klu reprimiert werden. Die Expression der proneuralen Antagonisten wird vermindert und dadurch die SOP- bzw. Borstenbildung gefördert. Die Expression von HA-enklu<sup>AN</sup> führt somit zu einem vergleichbaren Phänotyp wie die Expression von *klu*. Allerdings ist das Konstrukt konstitutiv aktiv und unterliegt nicht der endogenen Regulation. Dementsprechend ist der durch ihn erzeugte Phänotyp stärker als der, der bei einer Überexpression von *klu* zu beobachten ist.

### 3.12 Weiterführende Arbeiten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente führten zu einem Modell, in dem Klu Teil eines bisher unbekanntem Repressorkomplexes ist. In diesem Komplex interagiert Klu über seinen N-Terminus mit anderen, bisher noch nicht identifizierten Proteinen, die ebenfalls eine wichtige Funktion für die Determination der SOPs besitzen. Um die Funktionsweise von Klu besser verstehen zu können, wäre es wichtig, diese Interaktionspartner zu identifizieren. Eine bekannte und effiziente Methode zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner ist die Durchmusterung einer genomischen Bibliothek mit Hilfe der Technik des „Yeast two Hybrid Systems“. Dieses System basiert auf der Rekonstitution modularer Transkriptionsfaktoren in Hefezellen. Dabei wird das zu untersuchende Protein (z.B. Klu) mit der DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors (Gal4) fusioniert. Die Moleküle der c-DNA Bibliothek, die auf Klu-bindende Proteine untersucht werden sollen,

werden mit der transkriptionsaktivierenden Domäne des Transkriptionsfaktors fusioniert. Kommt es zu einer Interaktion von Klu mit einem Molekül der Genbibliothek, können DNA-bindende und transkriptionsaktivierende Domänen aufgrund ihrer räumlichen Nähe den Promoter eines Reportergens in den Hefen aktivieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein derartiger Yeast two hybrid screen bereits initiiert. Ziel dieses Screens ist es, Proteine zu finden, die mit dem N-Terminus (Aminosäuren 1-583) von Klu interagieren. Als c-DNA Bibliothek wurde eine genomische c-DNA Bank aus 0-21h alten Drosophila-Embryonen von der Firma Clontech eingesetzt. Bisher wurden bereits alle notwendigen Vorarbeiten (Klonierungen, Transformationen, Kontrollen etc.) sowie das Durchmustern der c-DNA Bank mit niedriger Stringenz durchgeführt. Dabei konnten ca. 1400 unabhängige Klone isoliert werden. Diese Klone müssen in weiteren Arbeiten auf ihre Spezifität hin bei einer höheren Stringenz untersucht werden. Anschließend muss aus den Klonen, die als spezifisch angesehen werden, die c-DNA isoliert und weiter analysiert werden.

Ein zweiter wichtiger Punkt, um die Funktionsweise von Klu besser verstehen und interpretieren zu können, ist die Frage, welche(s) Zielgen(e) durch den Repressorkomplex in ihrer Expression reguliert werden. Eine relativ neue Methode, um den Einfluss eines Proteins auf die Expression von Genen zu untersuchen, ist die sogenannte DNA-Microarray Analyse (DNA-Chip Technologie). Durch diese Technik ist es möglich, das genomische Expressionsprofil zweier unterschiedlicher Zellen direkt miteinander zu vergleichen. Sie beruht darauf, dass auf einem Träger-Substrat strukturiert immobilisierte DNA mit unterschiedlich fluoreszenz-markierten Targetnukleinsäuren aus verschiedenen zu vergleichenden Geweben hybridisiert.

Eine entsprechende Analyse wurde bereits in Kooperation mit dem Labor von Michael Pankratz in Karlsruhe durchgeführt. Dabei wurde das Expressionsprofil von wildtypischen Embryonen mit solchen verglichen, die *klu* überexprimierten. Die Datensätze liegen vor, müssen aber noch ausgewertet werden und konnten daher noch nicht in diese Arbeit mit einfließen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien, Enzyme und Reaktionssets

Bei den verwendeten Verbrauchskemikalien handelte es sich, falls nicht anders vermerkt, um analysereine Substanzen (p.A.) folgender Firmen: Aldrich, Bachem, Fluka, Gibco-BRL, Merk, Pharmacia, Roth, Riedel-de-Häen, Roche Diagnostics GmbH, Serva, Sigma.

##### Feinchemikalien und Reaktionssets:

ABI PRISM Big Dye Terminator (V. 2.1)	Perkin Elmer
DNA-Standart (1 kb Leiter)	Gibco-BRL
Expand High Fidelity PCR-System	Roche
ECL Western blotting detection system	Amersham
Kaninchen Retikulozytenlysate (Retic)	Promega
PCR Purification Kit	Qiagen
GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma
Protein-Standard (Prestained, Broad Range)	NEB
Normales Ziegen Serum (NGS)	Dianova
SP6-RNA-Polymerase Message Kit	Ambion
SpinEx-Säulen	Costar
Vectashield Mounting Medium	Vector

##### Enzyme:

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Gibco-BRL, NEB, Roche

#### 4.1.2 Geräte und Arbeitsmaterialien

**Computer und Software:** Apple Macintosh, IBM-kompatibler PC.

Programme: Adobe Photoshop (Adobe Systems), Canvas (Deneba Systems), DNA-Strider (CFA), Endnote (Niles Software Inc.), GraphicConverter (Lemke Software), Filemaker Pro (Claris Corp.), IPLab Spectrum (Signal Analytics), Microsoft Office (Microsoft Corp.), Quicknailer (Stephen Baber & Softwhir), Vektor NTI (Informax/Invitrogen)

**Elektroporation:** Genepulser (Bio-Rad)

**Entwicklermaschine** (Agfa)

**Filme:** Hyperfilm ECL (Amersham)

**Filmkassetten** (Suprema)

**Filterpapier:** 3MM (Whatman), Faltenfilter (Schleicher & Schüll)

**Fotografie:** CCD-Kamera QUANTIX (Photometrics), ProgRes 3008 (Kontron Elektronik), PowerShot G3 (Canon)

**Geldokumentation** (Polaroid-System)

**Gelelektrophorese:** DNA/Protein (Eigenbau Inst. f. Genetik/Bio-Rad)

**Inkubatoren:** Heizblöcke, Wasserbäder, Heizschränke (Mettler)

**Mikromanipulator:** Axiolab (Zeiss)

**Mikroskope:** Axiovert 10, Axioplan, Stemi 2000-C, Stemi DCR (alle Zeiss)

**Mikrowellengerät** (Daewoo)

**Nitrocellulose:** Hybond ECL (Amersham)

**PCR-Maschinen:** Personal-Cycler, UNO-Block (beide Biometra)

**Plastikartikel:** Reaktionsgefäße, Petrischalen (Eppendorf, Falcon, Greiner)



**Quarzküvetten:** 104-QS, 1 ml, Schichtdicke 10 mm, 105-QS, 70µl, Schichtdicke 10 mm (beide Hellma)

**Sequenzierer:** ABI 377A DNA-Sequenzier (Perkin Elmer)

**Spektralphotometer:** Genequant II (Pharmacia), Spektralphotom. PMQ II (Zeis)

**Western-Blot-Maschine** (Bio-Rad)

**Zentrifugen** (Hettich, Heraeus, Sorvall, Beckmann)

**Zentrifugationszubehör:** Rotoren: G3, SS34, Rotorbecher: 50 ml und 500 ml (Beckmann)

## 4.2 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden zur Klonierung und/oder Sequenzierung eingesetzt:

**klu-001** TAATGGATCCATGACGATGGCAGAAGGCACC  
**klu-002** GACTCTAGAGAGGATTTTCGAGCCT  
**klu-003** TAATGAATTCGCGGCCGCTTGTGTTCTTGTGTAGGCAGGCAT  
**klu-004** TTTAACTAGTTCTAGTTGCTAGAT  
**klu-005** TAATGAATTC AAGCTTGCTTGTTCCTTTTTGC  
**klu-006** TAATGGATCCAACAATAACATAGTGGTT  
**klu-007** TAATGGATCCAATGGCATGGCCTGCAAG  
**klu-008** TATAGGATCCCTACCTGGAATCGTACCGCGTGTG  
**klu-009** CAGATGCATCATTTCGCAAGTGCCC  
**klu-010** ATTAGGATCCCTAACGCGAGGCCATGTGCTTGGC  
**klu-011** CTGTGCATGCGCAACGAAGTG  
**klu-012** TATACCCGGGCGGCATCTCCTCAACCACGGG  
**klu-013** CCCGGGAATGATATTGCCAAAGCCTAT  
**klu-014** ATATGGATCCCTACGGCATCTCCTCAACCACGGG  
**klu-015** ATATGGATCCGATGTGGCTTATGTATGCCCC  
**klu-016** TATACCCGGGTCTCGAGAGGGCAGGGGAAGGA  
**klu-017** ATATCCCGGGCTTCTCGCCGGTGTGGGTCT  
**klu-018** AATGCGGCCGCTTTTGTGTTCTTGTGTAGGC  
**klu-019** ATCCCGGGTGTCCAGCAGCGAATGGGAACCG  
**klu-020** CATCAAGAGCGAGCAACC  
**klu-021** AGAGTAGCTCCAACCACG  
**klu-022** GAAGACTGAGGAACCTTAATAC  
**klu-023** GGTGATTGAAATTGAGTAGC  
**klu-024** TATTATTGTGGTGCAGCTTG  
**klu-025** AGGTAATAGCCGAACAGAG  
**klu-026** GCACTCATGCTCTCAAAC  
**klu-028** GATCGCGGCCGCTCACGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGT  
ACGCGGCGCTCTCCGTCTTGACAACCAG  
**klu-029** CCACTCCAACAATAACAATC  
**klu-030** AACACGACAGCACGAAAC  
**klu-031** CGAGAAGCCCTACAAGTG  
**klu-032** TAATGGGCTGTTAAGACAC  
**klu-033** ATGAGTGCTGCCCTCTAAC  
**klu-034** AATCGAGGAGCCCAACTC  
**klu-035** TAAGATCTGATGTGGCTTATGTATGCCCC  
**klu-036** ATCCCGGGCTTGACTCCGGTGTGGAGGCGCAT  
**klu-037** ATCCCGGGACGTGCAAGGTGTGCGGTCAG  
**klu-038** GGATCCATGGCCCTGGAGGATCGCTGC  
**klu-039** ATAGATCTAGATCCCAGAGCAGATTTCTCTGGATT  
**klu-040** ATGGATCCCTATGGCTGGTGGTTGGGCGTGG  
**klu-041** ATGGATCCCTAGCTGGTGGTGGTGGTGGC  
**klu-042** ATGGATCCCTAGGGGATCTCAGTCTTGATGTCCAC

**klu-043** ATGGATCCCTAGGACCCATCATGATCTTCATCCTG  
**klu-044** ATGATATCAGATCCCAGAGCAGATTTCTCTGGATT  
**klu-045** ATGAATTCATGACGATGGCAGAAGGCACC  
**klu-046** ATGAATTCATGACGATGGCAGAAGGCACC  
**klu-047** AGCCATGGAGACTTCACCCAATGCTCAGGAG  
**klu-048** ATAAGTAGTCTACGGCATCTCCTCAACCACGGG  
**klu-049** ATGGATCCAGCACCAACAAGAAGCGCAGCAGT  
**klu-050** ATCCCGGGACCAGCGCTGCCACGCCCAACCAC  
**klu-051** ATCCCGGGCGGCGGTGGCATTGGCTTCTTCTC  
**klu-052** CCGCCGCAAATCACCAGCGCTGCCACGCCCAAC  
**klu-053** AACTAGAACTAGTTAAACTTCTAA  
**klu-054** GATATCGAGGACATTTCCGGCGAG  
**klu-055** GCTGGTGATTTGCGGCGGTGGCATTGGCTTCTT  
**VP16-01** TAGGATCCGCCCCCGACCGATGTCAGC  
**VP16-02** TAAGATCTCCACCGTACTCGTCAATTCC  
**pB-KS** TCGAGGTCGACGGTATC  
**UASPO1** CTGAAATCTGCCAAGAAG  
**UASPO2** AGGTGGGAATCTAAAATACAC

Von allen Oligonukleotiden wurde eine Arbeitslösung von 10 pmol/μl in ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec, Roth, Invitrogen und Sigma bezogen.

### 4.3 Antikörper:

#### 4.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Herkunft	AK-Nr.	Verdünnung	Bezugsquelle
β-Galactosidase	Kaninchen	59	S: 1/1500 S: 1/150 (prä)	Cappel Research Products
β-Galactosidase	Maus	281	S: 1/500	Sigma-Aldrich
HA	Ratte	139	S: 1/125 W 1/3000	Boehringer-Mannheim
Hindsight (Hnt)	Maus	TK	S: 1/50	Hybridoma Bank Iowa (#27B8 1G9)
Extramacrochaetae (Emc)	Kaninchen	TK	S: 1/1500	Yuh-Nung-Yan USCF
Notch (N)	Maus	TK	S: 1/500	Hybridoma Bank Iowa (#C17.9C6)
Wingless (Wg)	Maus	TK	S: 1/50	Hybridoma Bank Iowa (# 4D4)
Senseless (Sens)	Meerschweinchen	TK	S: 1/750	Hugo Bellen
Klumpfuß (Klu)	Kaninchen	TK	E: 1/500 W: 1/3000	W. Chia (Yang et al., 1997)
Delta (DI)	Maus	TK	S: 1/1000	Hybridoma Bank Iowa (#C594.9B)
Wheat-Germ-Agglutinin-Texas Red	Weizen	152	E:1/1500	MoBiTec

### 4.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper gegen (Herkunft)	gekoppelt mit	AK-Nr.	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen (Ziege)	Alexa 488	187 276	S: 1/500	MoBiTec
Kaninchen (Ziege)	Cy3	43	S: 1/25 (prä)	Dianova
Kaninchen (Ziege)	Alexa 568	226	S: 1/500	MoBiTec
Kaninchen (Ziege)	Cy5	182	S: 1/500	Dianova
Maus (Ziege)	Alexa 488	190 286	S: 1/500	MoBiTec
Maus (Ziege)	Rhodamin-RedX	183	S: 1/500	Dianova
Maus (Ziege)	Alexa 647	202	S: 1/250	MoBiTec
Meerschweinchen (Ziege)	Texas-Red	205	S: 1/500	
Ratte (Ziege)	Alexa 488	184	S: 1/500	MoBiTec
Ratte (Ziege)	Alexa 568	198	S: 1/500	MoBiTec

TK = Antikörper Labor Thomas Klein

### 4.4 Bakterien

Für Klonierungsarbeiten wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

*E. coli* DH10B: F<sup>-</sup> *endA1 hsdR17 supE44 thi-1 λ<sup>-</sup> recA1 relA1 gyrA96 Δ(argF-lacZYA) U169 φ80dlacZΔM15* (Grant et al., 1990)

*E. coli* XL1-Blue: F<sup>+</sup> :: *Tn10 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac* (Stratagene)

### 4.5 DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide

Für Klonierungen und zur Herstellung der verschiedenen *klu*-Konstrukte wurden die Grundgerüste der folgenden Vektoren verwendet: pBluescript II SK(-), pBluescript II KS (+) (beide Stratagene), pSP64 (Promega), pUAST (Brand und Perrimon, 1993). Als Helferplasmid bei der P-Element vermittelten Transformation von Fliegen diente: pUChsΔ2-3 (Mullins et al., 1989).

#### 4.5.1 In dieser Arbeit hergestellte DNA-Konstrukte

Name	Konstrukt	Vektor	Herstellung
KM001	Klu cDNA HindIII/EcoRI	pSP64	CNB4 (Klu cDNA von T. Klein) X TS002 (T. Schulze) HindIII/EcoRI

KM002	Klu BamHI/Xba Fragment (701-2050) in RG028	pSP64	PCR: Matrize CNB4, Primer klu001 + klu002 X RG28 (R. Grosskortenhaus) BamHI/Xba
KM003	Klu cDNA mit NotI am C-Terminus	pSP64	PCR: Matrize KM001, Primer klu004 + klu018 SpeI/Not; KM001 HindIII/SpeI; pSF767 (F. Sprenger) HindIII/Not 3 Fragment Ligation
KM004	HA-Klu EcoRI/Not cDNA	pBSKS	PCR: Matrize KM002, Primer klu002 + klu005 EcoRI/Xba; KM003 Xba/Not; CNB4 EcoRI/Not (Vektorfragment) 3 Fragment Ligation
KM005	HA-Klu EcoRI/Not cDNA	pSP64	KM002 x KM003 HindIII/SfiI
KM006	HA-Klu $\Delta$ 1-132	pBSKS	PCR: Matrize CNB4, Primer klu002 + klu006 X KM004 BamHI/Xba
KM007	HA-Klu $\Delta$ 1-170	pBSKS	PCR: Matrize CNB4, Primer klu002 + klu007 X KM004 BamHI/Xba
KM008	HA-Klu $\Delta$ 1-583	pBSKS	PCR: Matrize KM001, Primer klu015 + klu018 X KM004 BamHI/Not
KM009	HA-Klu $\Delta$ ZF1	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu011 + klu012 SphI/Xma; PCR: Matrize KM004, Primer klu013 + klu018 Xma/Not; KM004 SphI/Not (Vektorfragment) 3 Fragment Ligation
KM010	HA-Klu $\Delta$ 710-803	pSP64	PCR: Matrize KM004, Primer klu008 + klu009 Nsi/BamHI; KM004 HindIII/Nsi; pSF767 HindIII/BamHI (Vektorfragment) 3 Fragment Ligation
KM011	HA-Klu $\Delta$ 710-803	pBSKS	KM010 x KM004 SphI/Not
KM012	UAS-HA-Klu EcoRI/Not	pUAST	KM004 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM013	UAS-HA-Klu $\Delta$ 1-132	pUAST	KM006 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM014	UAS-HA-Klu $\Delta$ 1-170	pUAST	KM007 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM015	HA-Klu $\Delta$ 612-803	pBSKS	PCR: CNB4, Primer klu010 + klu011 SphI/BamHI x KM004 SphI/BamHI
KM016	Klu-HA	sPS64	PCR: Matrize KM001, Primer klu011 + klu028 Xba/Not x KM003 Xba/Not I
KM017	HA-Klu $\Delta$ ZF4	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu011 + klu017 SphI/Xma; PCR: Matrize KM004, Primer klu016 + klu018 Xma/Not; KM004 SphI/Not (Vektorfragment) 3 Fragment Ligation
KM018	HA-Klu $\Delta$ 586-803	pBSKS	PCR: Matrize CNB4, Primer klu011 + klu014 SphI/BamHI; KM011 EcoRI/SphI (1,5 kb Fragment); KM011 EcoRI/BamHI (Vektorfragment) 3 Fragment Ligation
KM020	HA-VP16Klu <sup>AN</sup>	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu018 + klu035 Bgl2/Not; PCR: Matrize lexA-VP16 (T. Seher), Primer VP01 + VP02 BamHI/Bgl2; KM004 BamHI/Not (Vektorfragment) 3 Fragment Ligation

KM021	UAS-HA-Klu $\Delta$ 1-583	pUAST	KM008 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM022	UAS-HA-Klu $\Delta$ ZF1	pUAST	KM009 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM023	UAS-HA-Klu $\Delta$ 710-803	pUAST	KM011 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM024	UAS-HA-Klu $\Delta$ 612-803	pUAST	KM015 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM025	UAS-Klu-HA	pUAST	KM016 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM026	UAS-HA-Klu $\Delta$ ZF4	pUAST	KM017 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM027	UAS-HA-Klu $\Delta$ 586-803	pUAST	KM018 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM028	UAS-HA-VP16Klu <sup>AN</sup>	pUAST	KM020 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM030	HA-enKlu <sup>AN</sup>	pBSKS	PCR: Matrize engrailed cDNA (S. Hans), Primer klu038 + klu44 BamHI/EcoRV; PCR Matrize Km004 Primer klu045 + klu018 EcoRV/Not; KM004 BamHI/Not (Vektorfragment)
KM031	HA-Klu $\Delta$ ZF1+2	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu037 + klu018 Xma/Not x KM009 Xma/Not
KM032	HA-Klu $\Delta$ ZF3+4	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu011 + klu036 SphI/Xma x KM017 Sph/Xma
KM033	UAS-HA-Klu $\Delta$ ZF1+2	pUAST	KM031 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM034	UAS-HA-Klu $\Delta$ ZF3+4	pUAST	KM032 x pUAS-GFPklu (T. Klein) EcoRI/Not
KM038	HA-Klu 1-500	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu001 + klu040 BamHI x KM011 BamHI
KM039	HA-Klu 1-400	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu001 + klu041 BamHI x KM011 BamHI
KM040	HA-Klu 1-300	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu001 + klu042 BamHI x KM011 BamHI
KM041	HA-Klu 1-200	pBSKS	PCR: Matrize KM004, Primer klu001 + klu043 BamHI x KM011 BamHI
KM042	UAS-HA-enKlu <sup>AN</sup>	pUAST	KM030 x KM028 EcoRI/Not
KM043	UAS-HA-Klu 1-400	pUAST	KM039 x KM012 EcoRI/Not
KM044	UAS-HA-Klu 1-500	pUAST	KM038 x KM012 EcoRI/Not
KM045	UAS-HA-Klu 1-300	pUAST	KM040 x KM012 EcoRI/Not
KM046	UAS-HA-Klu 1-200	pUAST	KM041 x KM012 EcoRI/Not
KM049	HA-NLS-Klu 350-583	pBSSK	PCR: Matrize KM018, Primer klu047 + klu048 NcoI/Spel x AD114 (A. Dienemann) NcoI/Spel
KM050	HA-Klu $\Delta$ 1-400	pBSKS	PCR: Matrize KM006, Primer klu049 + klu050 BamHI/Spel x KM007 BamHI/Spel
KM052	HA-NLS-Klu 350-583	pBSKS	KM049 x KM018 Nde/Not

KM053	UAS-HA-Klu $\Delta$ 1-400	pUAST	KM050 x KM012 EcoRI/Not
KM055	UAS-HA-NLS-Klu350-583	pUAST	KM052 x KM012 EcoRI/Not
KM057	HA-Klu $\Delta$ 426-489	pBSKS	PCR1: Matrize KM004 Primer klu001 + klu055 (linkes Fragment); PCR2: Matrize KM004 Primer klu052 + klu018 (rechtes Fragment), PCR3 Matrize PCR1+2 Primer klu001 + 018 BamHI/Spel X KM007 BamHI/Spel
KM058	UAS-HA-Klu $\Delta$ 426-489	pUAST	KM057 x KM021 EcoRI/Not

Alle Konstrukte wurden sequenziert.

## 4.6 Molekularbiologische Methoden

### 4.6.1 Lösungen, Puffer, Medien

#### Lösungen und Puffer:

Ammoniumacetat:	7,5 M in H <sub>2</sub> O
Ampicillin:	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Kanamycin:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
BSA:	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
DNA-Auftragspuffer:	1 x TAE; 60 mM EDTA; 50% Glycerin; 0,1% w/v Xylencyanol; 0,1% Bromphenolblau
EDTA:	0,5 M in H <sub>2</sub> O, pH 8,0
Ethidiumbromid:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Ligasepuffer (10x):	500 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM DTT; 10 mM ATP; 250 µg/ml BSA
Lithiumchlorid:	5 M in H <sub>2</sub> O
Lysepuffer:	200 mM NaOH; 1% w/v SDS
Neutralisationspuffer:	5 M Kaliumacetat, pH 6,0
Natriumacetat:	3 M in H <sub>2</sub> O, pH 5,1
PCR-Puffer (10x):	100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,01% Gelantine
Phenol/Chloroform:	1 Vol. puffergesättigtes Phenol; 1 Vol. Chloroform
TAE (50x):	2 M Tris-Acetat; 0,05 M EDTA, pH 8,5
TE:	1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
TE/RNase:	TE mit 10 µg/ml RNase

#### Medien:

LB-Medium:	10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,2 mit NaOH eingestellt; auf 1 l mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt
LB/Amp:	LB-Medium mit 50 µg/µl Ampicillin
LB/Kan:	LB-Medium mit 30 µg/µl Kanamycin
LB/Amp-Agarplatten:	LB-Medium mit 1,5% Agar; 50 mg/ml Ampicillin; 100 µg/ml Methicillin
LB/Kan-Agarplatten:	LB-Medium mit 1,5% Agar; 30 mg/ml Kanamycin
Terrific Broth:	Lösung A: 12 g Bactotrypton; 24 g Bacto-Hefeextrakt; 4 ml Glycerin in 900 ml H <sub>2</sub> O Lösung B: 2,31 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 12,54 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; in 100 ml H <sub>2</sub> O; beide Lösungen wurden autoklaviert und nach Abkühlung unter 60°C gemischt

#### 4.6.2 Alkalische Lyse (Miniprep) von Plasmid-DNA

Verfahren zur schnellen Extraktion von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen. Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Ish-Horowicz und Burke, 1981) verwendet.

2 ml LB/Amp-Medium wurden mit Bakterien einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und der Ansatz für 12-15 Std. auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. 1,5 ml der Bakterienkultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (1 min, 14000 Upm, RT) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl TE resuspendiert und durch Zusatz von 100 µl Lysepuffer lysiert. Nach dem Mischen und einer kurzen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer. Der Ansatz wurde erneut gemischt und das Lysat für 1 min zentrifugiert (14000 Upm, RT).

Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl EtOH versetzt, durchmischt und die DNA durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm, RT) präzipitiert. Das Präzipitat wurde dann mit 80% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (3 min, 14000 Upm, RT).

Nach Abnahme des Überstandes wurde das Präzipitat für ca. 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl TE/RNase (10 µg/ml) resuspendiert. Für die Restriktionsanalyse wurden 2-4 µl der Lösung eingesetzt.

Sollte die gewonnene Plasmid-DNA für eine Sequenzierung verwendet werden, erfolgte vor der Ethanolfällung noch eine Phenol/Chloroform Extraktion.

#### 4.6.3 Alkalische Lyse (Midiprep) von Plasmid-DNA

Methode zur Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA. Sie basiert gleichfalls auf dem Protokoll von Ish-Horowitz und Burke (1981), wurde jedoch stark modifiziert.

Bakterien aus 50 oder 100 ml einer Übernachtskultur wurden in Falconröhrchen abzentrifugiert (10 min, 4000 Upm, RT, Heraeus-Zentifuge) und das Bakterienpellet in 10 ml TE resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Lysispuffer wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 10 ml Neutralisationspuffer versetzt, durchgemischt und erneut zentrifugiert (10 min, 4000 Upm, RT). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Falconröhrchen überführt und die darin enthaltenen Nucleinsäuren durch Zugabe von 20 ml Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Nucleinsäuren durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm, 4°C) sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Nucleinsäure-Pellet in 2 ml TE resuspendiert, mit 2 ml 5 M LiCl (eiskalt) vermischt und zur RNA-Fällung für 15 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde über Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde in ein frisches 15 ml Falconröhrchen überführt, mit je 4 ml TE und 4 ml Isopropanol versetzt und zur Fällung der DNA für 10 min auf Eis inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 4000 Upm) bei 4°C. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 250 µl TE/RNase aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert, um mögliche RNA-Kontaminationen zu beseitigen. Danach wurde die DNA-Lösung einer Ethidiumbromid-Reinigung nach Stemmer (Stemmer, 1991) unterzogen (siehe auch (Kaspar, 2000)). Das derart aufgereinigte Präzipitat wurde in 200 µl TE resuspendiert, die Konzentration photometrisch bestimmt und eine Arbeitslösung von 1 µg/µl hergestellt.

Alternativ zu der hier beschriebenen Methode wurde die Plasmid DNA auch mit Hilfe des GenElute HP Plasmid Midiprep Kits von Sigma isoliert. Dabei wurde entsprechend dem von Sigma vorgegebenen Protokoll vorgegangen.

#### 4.6.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Methode zur selektiven Anreicherung von Nucleinsäure-Abschnitten definierter Länge und Sequenz. Sie basiert auf der enzymatischen Amplifikation einer DNA-Sequenz, die von zwei Oligonucleotid-Primern flankiert wird.

Standardamplifizierungen wurden mit dem Expand High Fidelity System (Roche) in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Um die Fehlerrate während der PCR-Reaktion möglichst gering zu halten, wurde mit einer hohen Konzentration an Matrizen-DNA und geringer Zyklenzahl (10-15) gearbeitet.

#### Standard PCR-Ansatz:

1 µg Matrizen-DNA  
 20 pmol der jeweiligen Primer  
 2 µM je dNTP (1 µl 10 mM dNTP-Mix)  
 5 µl 10X PCR-Puffer  
 0,8 U Expand High Fidelity Enzyme Mix  
 auf 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

#### Standard PCR-Reaktion:

10-15x	5 min	96°C (Initiale Denaturierung)
	30 sec	96°C
	30 sec	48-60°C (Abhängig vom GC-Gehalt der Primer)
	1 min/kb DNA	72°C
	5 min	72°C

#### 4.6.5 Behandlung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonucleasen

Für analytische Zwecke wurden 0,5-1 µg DNA eingesetzt. Der Verdau erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl für 2-4 h. Präparative Restriktionsverdau (5-10 µg DNA) wurden für 4-6 h oder über Nacht in einem Volumen von 50-80 µl durchgeführt. Die Menge an Enzym wurde der zu verdauenden DNA-Menge angepaßt. Die jeweiligen Salz- und Temperaturbedingungen entsprachen den Herstellerangaben.

#### 4.6.6 Dephosphorylierung von freien DNA-Enden

Methode zur Vermeidung der Religation des Vektors insbesondere bei Klonierungen über identische Enden.

Der entsprechende Restriktionsansatz wurde mit 1 U Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym hitzeinaktiviert (5 min bei 65°C) und die DNA-Fragmente elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

#### 4.6.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in der horizontalen Flachbettgelelektrophorese unter Standardbedingungen bei einer Feldstärke von ca. 10V/cm. Die dafür verwendeten Gele enthielten je nach Reaktionsbedingungen Agarosekonzentrationen zwischen 0,6% (präparativ) und 0,9-1,2% in einem Volumen von 100 ml 1 x TAE sowie Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die durch Ethidiumbromid angefärbte DNA auf einen Transilluminator (366 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert. Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Vergleich der Laufstrecken mit einem Molekulargewichtstandard (1 kb-Leiter von Gibco/BRL).



#### 4.6.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden zunächst in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht aus der Agarose ausgeschnitten und in SpinEx-Säulen (Costar) überführt. Zur Abtrennung der Agarose wurden die Agaroseblöckchen in den Säulen je zweimal für 10 min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  und RT inkubiert und im Anschluss daran für 10 min zentrifugiert (14000 Upm, RT). Um die DNA möglichst vollständig aus der Agarose zu lösen, wurde die Membran der Säule mit 50-100  $\mu\text{l}$  TE überschichtet und erneut für 3 min zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100% EtOH versetzt. Nach einer Inkubation von 1 Std. bei  $-70^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Sedimentation der DNA durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das Präzipitat wurde einmal mit 100  $\mu\text{l}$  80% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min, 14000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und an der Luft getrocknet. Die isolierte DNA wurde in 20  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und 1/10 Vol. zur Mengenabschätzung im Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.6.9 Ligation

Unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse (Vektor zu Fragment) wurden zur Klonierung von DNA-Fragmenten 100-200 ng des geschnittenen Vektors mit dem dreifachen Überschuss (bei „sticky-ends“) bzw. dem fünffachen Überschuss (bei „blunt-ends“) des zu integrierenden Fragments gemischt. Für die Ligation wurden die entsprechenden DNA-Mengen mit 1x Ligasepuffer und 0,8 U T4 DNA-Ligase versetzt und mit MPW auf ein Endvolumen von 10 oder 15  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde gemischt und für 2-4 Std. oder über Nacht bei  $18^{\circ}\text{C}$  ligiert.

#### 4.6.10 Präparation von elektrokompetenten Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 20 ml LB mit einer Kolonie *E. coli* XL1-Blue oder DH10B-Zellen angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Mit 10 ml der Übernachtskultur wurde 1 l Terrific Broth-Medium inokuliert und die Bakterien für 2-3 h auf einem Schüttler bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5-0,6 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 Upm im G3 Rotor,  $4^{\circ}\text{C}$ ), in 1 Vol. eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 6000 Upm im G3 Rotor,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Die sedimentierten Zellen wurden dann in 0,5 Vol eiskaltem 10% Glycerin gelöst und nochmals zentrifugiert (20 min, 8000 Upm im G3 Rotor,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde zügig abgenommen, das Pellet in 20 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und die Suspension in 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation (7 min, 4000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ , Heraeus-Zentifuge) wurden die Zellen zunächst in 2 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen, dann in 30  $\mu\text{l}$  Proben aliquotiert und auf flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.11 Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen

Die Transformation elektrokompetenter Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1/10 (1-1,5  $\mu\text{l}$ ) des Ligationsansatzes versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden bei 2,25 kV und einer Kapazität von 25  $\mu\text{F}$  mit einer Pulslänge von etwa 4-5 ms elektroporiert und anschließend in 2 ml LB-Medium aufgenommen. Nach einer Regenerationszeit von 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden 50  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  der Suspension auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert.

#### 4.6.12 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Die Transformation chemisch kompetenter Zellen erfolgte durch Hitzeschock. Dazu wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit der Hälfte des Ligationsansatzes (5 µl bzw. 7,5 µl) gemischt und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einem Heizblock für 1,5 min einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und unmittelbar danach nochmals für 2 min auf Eis gestellt. Schließlich wurden 900 ml LB-Medium hinzugefügt und für ca. 1 Std. bei 37°C geschüttelt. Von diesem Ansatz wurde ein geeignetes Volumen (100 µl und 300 µl) auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 100 µg Ampicillin / ml) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 4.6.13 Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mit Hilfe des PCR gestützten ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Primer wurden entweder Standardprimer (T3, T7, KS) oder für das jeweilige Konstrukt spezifische Primer verwendet.

Ansatz für die PCR-Sequenzreaktion:

- 1 µg Plasmid DNA
- 3-5 pmol Primer
- 4 µl Big Dye Lösung
- auf 20 µl auffüllen mit H<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

- |     |               |
|-----|---------------|
|     | 96°C – 5 min  |
|     | 96°C – 5 min  |
| 25X | 50°C – 15 sec |
|     | 60°C – 4 min  |

Nach der PCR wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und die DNA durch eine NaAc/EtOH Fällung präzipitiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Speedvac oder an der Luft getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 4.7 Drosophila Methoden

#### 4.7.1 Lösungen, Puffer, Medien

Embryo-Homogenisierungspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 80 mM K-β-Glycerophosphat; 20 mM EGTA; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% Glycerol; 1 mM Benzamidin; 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM DTT; 12% Inhibitor Cocktail Mix Sigma P 8340

Fixierlösung: 4% oder 6% Formaldehyd in PBS

Fliegenfutter: 240 g Agar werden in 10 l H<sub>2</sub>O für 2,5 Std. gekocht. Anschließend werden 2,4 kg Maismehl, 430 g Trockenhefe, 300 g Sojamehl, 2,4 kg Malzextrakt und 630 g Zuckerrübensirup in 15 l Wasser zugegeben und die Mischung weitere 4,5 Std. gekocht. Bei einer Temp. von 60 °C werden 190 ml Propionsäure zugefügt und das Futter in die entsprechenden Becher (Ø 2,5 cm, † 6 cm oder Ø 4,5 cm, † 9,5 cm) gegossen, so dass die Becher ca. zu 1/3 gefüllt sind.

Hoechst Farbstoff (bis-Benzimid): 1/15000 in PBT

Hoyers Medium:	30g Gummi-Arabicum + 50 ml H <sub>2</sub> O über Nacht rühren, unter rühren + 200 g Choralhydrat, 16 ml (20 g) Glycerin – in Sorvall zentrifugieren und Klarheit mikroskopisch prüfen
Klorix:	Chlorbleiche (Natriumhypochlorid) 1:1 in H <sub>2</sub> O
NGS:	Ziegenserum 60 mg/ml
4% Paraformaldehyd:	4 g Paraformaldehyd in 80 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, 3 Tropfen NaOH hinzufügen, mit 5 ml 20 x PBS versetzen und auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, auf pH 7,2 mit NaOH einstellen.
PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 mit HCl
PBT:	0,3% Tween20 in PBS

#### 4.7.2 Fliegenstämme

Als Wildtyp-Stamm und zur (Lindsley und Zimm, 1992) Herstellung transgener Fliegen mittels DNA Injektion wurde *white* (*w*<sup>1118</sup>, abgekürzt als *w*) verwendet. Alle verwendeten Marker sind bei (Lindsley und Zimm, 1992) beschrieben.

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
F232	<i>w</i> ; <i>lf</i> / <i>Cyo</i> <sup><i>wg-lacZ</i></sup> ; MKRS / TM6b	Frank Sprenger
TK-0055	<i>w</i> ; UASN (III)	Thomas Klein
TK-0073	<i>w</i> ; <i>Df(1)sc</i> <sup>10.1</sup> / FM6; UAS <i>enKlu</i> <sup><i>ΔN15-2</i></sup> / TM2	Thomas Klein
TK-0235	<i>ms1096</i> ; A101. F3 / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-0434	<i>w</i> ; UAS <i>klu</i> / SM6a-TM6b	Thomas Klein
TK-0435	<i>w</i> ; UAS <i>klu</i> , <i>m8-lacZ</i> / SM6a-TM6b	Thomas Klein
TK-0437	<i>w</i> ; UASGFP; <i>kluGal4</i> A101.F3 / SM6a-TM6b	Thomas Klein
TK-0443	<i>w</i> ; <i>kluGal4</i> UASGFP / TM6b	Thomas Klein
TK-0446	<i>w</i> ; <i>lf</i> / <i>Cyo</i> <sup><i>wg-lacZ</i></sup> ; <i>kluGal4</i> UASGFP / TM6b	Thomas Klein
TK-0454	<i>w</i> ; <i>lf</i> / <i>Cyo</i> <sup><i>wg-lacZ</i></sup> ; <i>kluGal4</i> A101. F3 / TM6b	Thomas Klein
TK-0471	<i>w</i> ; UASGFP; <i>kluGal4</i> A101. F3 / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-0475	<i>w</i> ; SMCE; <i>kluGal4</i> UASGFP / SM6a -TM6b	Thomas Klein
TK-0769	<i>w</i> ; <i>kluGal4</i> A101. F3 / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-0771	<i>w</i> ; <i>kluGal4</i> A101. F3 / TM6b	Thomas Klein
TK-0777	<i>w</i> ; UAS <i>klu</i> ; UASN (III) / SM6b-TM6b	Thomas Klein
TK-0970	hsFLP1.22 ; <i>sca-lacZ</i> ; <i>AyGal4</i> 17b / SM6a - TM6b	Thomas Klein

TK-0999	$w^-$ ; <i>sca-lacZ</i> ; <i>kluGal4</i> UASGFP / SM6a-TM6b	Thomas Klein
TK-1051	$w^-$ ; UAS <i>klu</i> ; <i>grh2,5</i> Su(H) 4x lac Z / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-1055	$w^-$ ; <i>Df(1)sc<sup>10.1</sup></i> / FM6; <i>kluGal 4A101</i> / TM2	Thomas Klein
TK-1231	$w^-$ ; UASGFP <i>klu</i> / SM6a-TM6b	Thomas Klein
TK-1349	$w^-$ ; <i>scaGal 4</i> ; UASGFP / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-1403	$w^-$ ; <i>sca-lacZ</i> ; <i>kluGal4</i> / SM6a-TM6b	Thomas Klein
TK-1829	$w^-$ ; UAS <i>sc39</i> (II)	Thomas Klein
TK-1982	hsFLP1.22; IF / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-1989	$w^-$ ; <i>sc-lacZ</i> ; <i>dppGal4</i> UASGFP / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-1994	hsFLP1.22 ; <i>AyGal4</i> UASGFP; A101 / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2027	OC-10; <i>AyGal4</i> UAS GFP; hsFLP86E MKRS / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2048	$w^-$ ; IF / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-2049	OC10; IF / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-2050	OC-10; UASGFP <i>klu</i> / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2051	$w^-$ ; <i>sc-lacZ</i> / <i>Cyo<sup>wg-lacZ</sup></i> ; UAS HA <i>klu<sup>1-12</sup></i> / TM6b	Thomas Klein
TK-2052	$w^-$ ; <i>sc-lacZ</i> ; <i>kluGal4</i> UASGFP / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-2053	hsFLP1.22 ; <i>AyGal4</i> UASGFP / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2054	$w^-$ ; UAS <i>klu</i> ; ASC DC9 / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2055	$w^-$ ;ASC DC8; <i>kluGal4</i> UASGFP / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2056	hsFLP1.22 ; <i>AyGal4</i> UASGFP; SMCE / SM6a - TM6b	Thomas Klein
TK-2057	<i>y w</i> hsFLP1.22 <i>tubGal4</i> UASGFP / FM7 FRT40A <i>Gal80</i> / <i>Cyo<sup>wg-lacZ</sup></i>	Thomas Klein
TK-2058	$w^-$ ; <i>da<sup>IB6</sup></i> FRT40A; UASHA <i>klu<sup>1-12</sup></i> / SM6a- TM6b	Thomas Klein
TK-2059	$w^-$ ; <i>da<sup>IB6</sup></i> FRT40A; UAS <i>SenKlu<sup>ΔN15-2</sup></i> / SM6a- TM6b	Thomas Klein
T-KM001	UAS HA <i>klu</i>	Transformation
T-KM002	UAS HA <i>kluΔ1-132</i>	Transformation
T-KM003	UAS HA <i>kluΔ1-170</i>	Transformation
T-KM005	UAS HA <i>kluΔ584-619</i> (DZF1)	Transformation
T-KM006	UAS HA <i>kluΔ680-711</i> (DZF4)	Transformation

T-KM007	UAS <i>klu</i> HA	Transformation
T-KM008	UAS HA <i>klu</i> Δ612-803	Transformation
T-KM009	UAS HA <i>klu</i> Δ583-803	Transformation
T-KM010	UAS HA <i>klu</i> Δ1-583	Transformation
T-KM011	UAS HA <i>klu</i> Δ710-803	Transformation
T-KM012	UAS HA VP16 <i>klu</i> <sup>ΔN</sup>	Transformation
T-KM013	UAS HA <i>klu</i> Δ584-653 (DZF1+2)	Transformation
T-KM014	UAS HA <i>klu</i> Δ652-711 (DZF3+4)	Transformation
T-KM015	UAS HA en <i>klu</i> <sup>ΔN</sup>	Transformation
T-KM016	UAS HA <i>klu</i> Δ501-803	Transformation
T-KM017	UAS HA <i>klu</i> Δ401-803	Transformation
T-KM018	UAS HA <i>klu</i> Δ1-400	Transformation
T-KM020	UAS HA NLS <i>klu</i> 350-803	Transformation
T-KM021	UAS HA <i>klu</i> Δ426-489	Transformation
T-KM051	<i>w</i> <sup>-</sup> ; UAS HA <i>klu</i> <sup>1-12</sup> / SM6a-TM6b	T-KM001.12 x TK-2048
T-KM052	<i>w</i> <sup>-</sup> ; UAS HA <i>klu</i> Δ583-803 <sup>9-8</sup> / SM6a-TM6b	T-KM009.8 x TK-2048
T-KM060	OC10; UAS HA en <i>klu</i> <sup>ΔN15-2</sup> / SM6a-TM6b	T-KM015.2 x TK-2049
T-KM070	<i>w</i> <sup>-</sup> ; sclacZ; UAS HA <i>klu</i> <sup>1-12</sup> / SM6a-TM6b	TK-2051 x TK-2048

Die Transformanten wurden gegen den Doppelbalancer-Stamm F232 (IF/CyO; MKRS/TM6b) ausgekreuzt und Linien auf dem I, II und III Chromosom etabliert.

In der Regel wurden alle drittchromosomalen Stämme mit dem Balancerchromosom TM6b etabliert. Dieses Chromosom trägt die dominante Mutation *Tubby* (*Tb*), welche den Tieren ab dem zweiten Larvenstadium eine erkennbare gedrungene Körperform verleiht. Dadurch ist es möglich, entweder homozygote Larven oder bei Kreuzungen Larven mit beiden gewünschten Konstrukten anhand ihrer Morphologie eindeutig zu erkennen.

#### 4.7.3 Fliegenhaltung

Die Fliegenhaltung erfolgte in zylindrischen Futterröhrchen, die zu 1/3 mit Fliegenfutter gefüllt waren und durch einen Schaumstoffstopfen verschlossen wurden. Die Fliegen wurden entweder bei 18°C oder falls eine kürzere Generationszeit angestrebt wurde bei RT gehalten. Fliegen im 18°C-Raum wurden alle 4 Wochen, bei RT alle 2-3 Wochen in neue Futterröhrchen umgesetzt. Für die Expansion von Stämmen wurden die Fliegen bei RT gehalten und alle 3-4 Tage in neue, große Futterröhrchen umgesetzt. Für größere Eiablagen wurden ca. 400-500 Fliegen in einem großen Legekäfig gehalten. Dieser bestand aus einem zylindrischen Kunststoffrohr, dessen obere Öffnung mit einem

feinmaschigen Drahtnetz bespannt war und dessen untere Öffnung durch eine Apfelsaft-Agarplatte mit etwas Bäckerhefe verschlossen wurde. Die Fliegen legten ihre Eier auf die Platte und in die Hefe, so dass durch das Wechseln der Apfelsaft-Agarplatte das Gelege gesammelt werden konnte. Durch den zeitlich kontrollierten Wechsel der Platten war es möglich, Embryonen zu gewinnen, die sich alle in einem bestimmten „Zeitfenster“ der Entwicklung befanden. Detaillierte Beschreibungen zur Fliegenzucht finden sich bei (Roberts, 1998) und (Ashburner, 1989).

#### **4.7.4 Dechorionierung von *Drosophila* Embryonen**

Zum Dechorionieren wurden die auf einer Apfelsaft-Agarplatte gesammelten Embryonen (s. Abschn. 4.7.3) mit 50%iger Chlorbleiche (Klorix) überschichtet und für 1-2 min inkubiert. Danach wurden die Embryonen in ein Gaze-Sieb gegossen und unter fließendem Leitungswasser für ca. 1 min gewaschen.

#### **4.7.5 Formaldehyd-Fixierung von *Drosophila* Embryonen**

Die Fixierung der Embryonen erfolgte an der Phasengrenze zwischen 4% Formaldehyd und Heptan im Verhältnis 1:1. Dazu wurden je 750 µl der Fixierlösung (81 µl 37% Formaldehyd + 669 µl 0,1 PBT) und des Heptans in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und die dechorionierten Embryonen mit einem Pinsel in die Heptanphase überführt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die untere formaldehydhaltige, wässrige Phase abgenommen und der Ansatz mit 1 Vol. Methanol versetzt (750 µl). Zur Entfernung der Vitellinmembran wurde für ca. 1 min gevortext. Die devitellinisierten Embryonen sanken zu Boden. Der gesamte Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Embryonen mehrmals kurz mit Methanol gewaschen. Die fixierten Embryonen können in Methanol bei -20°C gelagert werden.

#### **4.7.6 Methanol-Fixierung von *Drosophila* Embryonen**

Dechorionierte Embryonen wurden mit einem Pinsel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt in dem 1,5 ml eines MeOH/Heptan-Gemisches (1:1) vorgelegt war. Der Ansatz wurde für 20 min auf einem Drehrad bei RT inkubiert. Die fixierten, dehydrierten Embryonen sanken zu Boden. Der gesamte Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Embryonen mehrmals kurz mit Methanol gewaschen. Die Lagerung der fixierten Embryonen erfolgte bei -20°C ebenfalls in Methanol.

#### **4.7.7 Antikörperfärbung von *Drosophila* Embryonen**

Bei allen nachfolgenden Wasch- und Färbeschritten sollten die Embryonen auf einem Drehrad über Kopf rotiert werden.

Die fixierten und in Methanol gelagerten Embryonen müssen zunächst rehydriert werden.

- Embryonen 5 x kurz mit PBT waschen
- 1 Std. Inkubation mit 5% NGS in PBT (absättigen unspezifischer Bindungsstellen)
- Inkubation mit dem primären Antikörper in 5% NGS in PBT für 2 Std. bei RT (alternativ über Nacht bei 4°C)
- Abnehmen des primären Antikörpers
- 1 x kurz mit PBT waschen
- 3 x 15 min mit PBT waschen (entfernen von nicht gebundenen primären Antikörper)
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 5% NGS in PBT für 2 Std. bei RT
- 1 x kurz mit PBT waschen
- 3 x 15 min mit PBT waschen (entfernen von nicht gebundenen sekundären Antikörper)
- Einbettung der Embryonen in Vectashield Einbettungsmedium auf einem Objektträger

#### 4.7.8 Herstellung transgener Fliegen mittels DNA-Injektion

Die Herstellung transgener Fliegen erfolgte über P-Element vermittelter Transformation von *Drosophila* Embryonen. Bei dieser Methode wird die DNA mit Hilfe eines Transporters stabil in die chromosomale DNA der Fliege integriert (Rubin und Spradling, 1982). Als Carrier wurde der P-Elementvektor pUAST verwendet. Injiziert wurden 0,5-1 Std. alte *white* Embryonen mit einer DNA-Lösung aus P-Elementvektor (400 ng/μl) und Helferplasmid ( $\Delta^{2-3}$ -Transposase Vektor) (100 ng/μl) in Zellkulturwasser. Die möglichen Transformanten wurden durch Auskreuzen mit dem Doppelbalancer-Stamm F232 (IF/CyO; MKRS/TM6b) auf chromosomale Insertionen überprüft.

#### 4.7.9 DNA-Injektion in Embryonen

- 0-0,5h alte Embryonen dechorionieren
- Embryonen auf einem Apfelsaftagarblöckchen aufreihen (50-80 Stück, max. 15 min) und auf ein mit Heptan-Kleber präpariertes Deckglas transferieren
- Embryonen in einem Exikator mit Silikagel für ca. 7-8 min trocknen lassen
- nach dem Trocknen Deckgläschen auf einen Objektträger montieren und die Embryonen mit 10S Voltalef-Öl überschichten
- beladen der Injektionsnadel mit 0,8 μl DNA-Lösung und Injektion der Embryonen in einer Mikroinjektionsapparatur
- nach der Injektion Deckgläschen mit den Embryonen in eine kleine Petrischale überführen und mit 3S Voltalef-Öl überschichten
- nicht injizierte Embryonen mit einer Nadel entfernen
- Petrischale in ein feuchtes Gefäß überführen und Embryonen bei RT oder 25°C entwickeln lassen
- nach ca. 24 Std. geschlüpfte Larven mit einer Nadel absammeln und in ein Futterröhrchen mit Hefe überführen.

#### 4.7.10 Präparation und Antikörperfärbung von Imaginalscheiben

Für die Präparation von Flügel-, bzw. Beinimaginalscheiben wurden in der Regel Larven des mittleren oder späten dritten Larvenstadiums verwendet. Diese waren daran zu erkennen, dass sie den Futterbrei gerade verlassen bzw. schon verlassen hatten.

- Larven in eiskaltes PBS überführen, in der Mitte zerteilen und die vordere Hälfte umstülpen
- Imaginalscheiben vorsichtig frei präparieren

Für die folgenden Schritte werden die Scheiben in ein Siebchen überführt, das sich in der Vertiefung einer Multiwellplatte befindet

- 30 min in 4% Paraformaldehyd bei RT fixieren
- 3x 10 min mit 0,3% PBT waschen
- 30 min in 5% NGS/0,3PBT bei RT blockieren (alternativ über Nacht bei 4°C)
- Inkubation mit primären Antikörper in 5% NGS/0,3PBT für 1,5 Std. bei RT
- 3x 20 min mit 0,3 PBT waschen
- Inkubation mit sekundären Antikörper in 5% NGS/0,3PBT für 1 Std. bei RT
- 3x 20 min mit 0,3 PBT waschen
- Scheiben abpräparieren und auf einen Objektträger in einen Tropfen Vectashield Einbettungsmedium überführen (bei Fluoreszenzfärbungen)
- Nach der Präparation aller Scheiben überflüssiges PBT mit einer Spritze (27G Kanüle) entfernen und gegebenenfalls noch etwas frisches Einbettungsmedium hinzufügen
- Scheiben mit Deckgläschen bedecken
- Überschüssiges Medium mit einem saugfähigen Papiertuch entfernen
- Die Lagerung der Präparate erfolgt im Dunkeln bei 4°C

#### 4.7.11 Kutikula Präparation von adultem Gewebe

Für die Kutikula Präparationen von adulten Körperteilen wurden die Fliegen zunächst in Methanol gesammelt. Die Präparation erfolgte ebenfalls in Methanol. Das freipräparierte Gewebe wurde in einen Tropfen Hoyers Medium überführt und eingedeckelt. Zur besseren Verteilung des Mediums wurde das Deckgläschen mit einem Bleigewicht beschwert. Die Präparate wurden zur Klärung über Nacht bei 65°C auf einem Heizblock inkubiert.

#### 4.7.12 Das UAS/Gal4-Expressionssystem

Bei dem UAS/Gal4-System handelt es sich um ein *in vivo* System, welches die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem definierten Gewebe erlaubt (Brand und Perrimon, 1993). Das System besteht aus zwei transgenen Fliegenlinien: einer Gal4-Treiber-Linie (Aktivator-Komponente) und einer Linie, bei der das zu untersuchende Gen hinter eine sogenannte „upstream activating sequence“ (UAS) kloniert wurde (Effektor-Komponente). In der Gal4-Treiber-Linie wird ein natürlicherweise nicht vorkommender Transkriptionsfaktor (Gal4) aus Hefe unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert. Kreuzt man die Treiber-Linie mit einer bestimmten UAS-Linie, so bindet Gal4 an die UAS-Sequenzen und induziert so die Expression des gewünschten Gens. Auf diese Weise ermöglicht dieses System *in vivo* die durch den Promotor der Treiber-Linie spezifizierte räumlich und zeitlich gerichtete Expression eines bestimmten DNA-Abschnitts. Die Expression von Gal4 allein hat keine Auswirkungen, da Gal4 nicht als Aktivator für *Drosophila* Gene fungieren kann. Ebenso können die UAS-Sequenzen von endogenen Transkriptionsfaktoren nicht aktiviert werden. Erst nach Kreuzung von Aktivator- und Effektor-Stamm kommt es in dem Teil der Nachkommenschaft, die beide Komponenten trägt, zur ektopischen Expression des Zielgens.

#### 4.7.13 UAS/Gal4 abhängige Expression in Klonen mittels FLP/FTR vermittelter mitotischer Rekombination

Die klonalen Überexpressionsstudien von UAS-Konstrukten wurden mit Hilfe eines Expressionssystems durchgeführt, welches das FLP/FRT System (Golic und Lindquist, 1989; Xu und Rubin, 1993) mit dem UAS/Gal4 System (Brand und Perrimon, 1993) verbindet. Mit Hilfe dieses Systems lassen sich Klone induzieren, die das zu analysierende UAS-Konstrukt ektopisch exprimieren. Die zentrale Komponente dieses Systems ist *AyGal4*, ein Fusionsgen zwischen der Promotorsequenz von ubiquitär exprimierten, cytoplasmatischen Actin (*Actin5C*) und dem *GAL4* Gen (Ito et al., 1997). Zwischen dem Promotor und dem *GAL4* befindet sich eine FRT Kasette, die ein Transkriptions-Terminationssignal und ein Markergen (*yellow*) enthält. Im Grundzustand bricht die Transkription daher hinter dem Promoter ab und das *GAL4* Gen wird nicht exprimiert. In Gegenwart der FLPase erfolgt eine Rekombination an den FRT Sequenzen der Kasette, was zum Verlust der Kasette samt Terminationssignal und Markergen führt. Es bildet sich ein funktionales Actin-Promotor-GAL4 Fusionsgen. Die Expression von *GAL4* aktiviert dann die zu analysierenden UAS-Konstrukte. Als FLPase Quelle dient ein *hs-FLP*-Stamm, bei dem die Expression der FLPase unter der Kontrolle des *hsp70* Promotors steht. Durch den gezielten Einsatz des Hitzeschocks ist es möglich, die FLPase und damit die Rekombination nur in einigen Zellen zu induzieren. Diese Zellen teilen sich weiter und bilden Klone in dem jeweiligen Gewebe der Fliege. Es entstehen einzelne *GAL4* exprimierende Zellklone, die von Zellen umgeben sind, die kein *GAL4* exprimieren. Durch die Verwendung von *UAS-GFP* zusätzlich zu dem zu untersuchenden UAS-Konstrukt ist es möglich, die *GAL4* exprimierenden Klone positiv zu markieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stamm verwendet, der sowohl die FLPase Quelle (*hsFLP1.22*), als auch das *AyGAL4*-Element und *UAS-GFP* enthielt. Dieser Stamm wurde mit dem zu untersuchenden Effektorstamm gekreuzt. Der Hitzeschock wurde in der F1 im ersten Larvenstadium für 10 min bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Die Präparation



der Imaginalscheiben erfolgte 48-96 Std. nach dem Hitzeschock. Positive Klone konnten durch das Fluoreszenzsignal von GFP identifiziert werden.

#### 4.7.14 Das MARCM-System

Durch das MARCM („Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker“) System (Lee und Luo, 1999) ist es möglich, eine klonale Analyse von embryonal letalen Mutationen durchzuführen und in diesen Klonen gleichzeitig UAS-Konstrukte ektopisch zu exprimieren. Es kombiniert die Systeme UAS/GAL4 und FLP/FTR mit einem weiteren Protein aus *S. cerevisiae*, dem GAL80. Das GAL80 Protein agiert als Repressor, bindet an GAL4 und verhindert so die Transkription von DNA-Sequenzen die hinter die UAS-Erkennungssequenz kloniert wurden. Steht das GAL80 selbst unter der Kontrolle eines ubiquitär exprimierenden Promotors, wird das UAS/GAL4 System im gesamten Individuum deaktiviert. Durch den Einsatz des FLP/FTR Systems ist es möglich, mittels einer FLPase induzierten Rekombination das GAL80 aus einzelnen Zellen zu entfernen und in diesen Zellen das UAS/GAL4 System zu aktivieren. Dazu muss sich das GAL80 auf einem Chromosom mit einer FRT Insertion befinden. Kombiniert man das GAL80 mit der zu analysierenden Mutation und befinden sich beide Komponenten in trans auf homologen FRT-Chromosomen, so entstehen durch eine FLPase induzierte Rekombination Zellen, die homozygot für die Mutation sind. Gleichzeitig haben diese Zellen das Gen für das GAL80 verloren, das nun homozygot in dem Schwesterklon vorliegt. Der Verlust von GAL80 bewirkt, dass in diesen Zellen das UAS/GAL4 System aktiviert wird. Gal4 kann an die UAS-Sequenzen binden und so die Expression des gewünschten Gens induzieren. Es bilden sich Zellklone, die homozygot für eine bestimmte Mutation sind und gleichzeitig ein oder mehrere UAS-Konstrukte exprimieren. Durch die Verwendung eines UAS-*GFP* Markergens ist es möglich, die GAL4 exprimierenden, homozygot mutanten Klone positiv zu markieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stamm verwendet, der die FLPase Quelle (hsFLP1.22), das GAL4 Gen (*tubGAL4*), das UAS-*GFP* Markergen und das GAL80 Gen enthielt. Dieser Stamm wurde mit einem Stamm gekreuzt, der die zu untersuchende Mutation und das entsprechende UAS-Konstrukt trug. Die Expression der FLPase wurde durch einen Hitzeschock im 1-2 Larvenstadium für 1 Std. bei 37°C im Wasserbad induziert. Die Präparation der Imaginalscheiben erfolgte 48-72 Std. nach dem Hitzeschock. Positive Klone konnten durch die Gegenwart des GFP-Fluoreszenzsignals identifiziert werden.

## 5. Literatur

- Allende, M. L., and Weinberg, E. S.** (1994). The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. *Dev Biol* 166, 509-530.
- Alonso, M. C., and Cabrera, C. V.** (1988). The achaete-scute gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *Embo J* 7, 2585-2591.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J.** (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 284, 770-776.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*. (Cold Spring Harbor, N Y; Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Bailey, A. M., and Posakony, J. W.** (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* 9, 2609-2622.
- Barolo, S., Stone, T., Bang, A. G., and Posakony, J. W.** (2002). Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev* 16, 1964-1976.
- Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.
- Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1990). Patterns of expression of cut, a protein required for external sensory organ development in wild-type and cut mutant *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 4, 1322-1331.
- Blochlinger, K., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1991). Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of Cut in *Drosophila*. *Genes Dev* 5, 1124-1135.
- Bodmer, R., Barbel, S., Sheperd, S., Jack, J. W., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1987). Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of *D. melanogaster*. *Cell* 51, 293-307.
- Botas, J., Moscoso del Prado, J., and Garcia-Bellido, A.** (1982). Gene-dose titration analysis in the search of trans-regulatory genes in *Drosophila*. *Embo J* 1, 307-310.
- Brand, A. H., and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brand, M., Jarman, A. P., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1993). asense is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119, 1-17.
- Bray, S., and Furriols, M.** (2001). Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. *Curr Biol* 11, R217-221.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.

- Cabrera, C., Alonso, M., and Huikeshoven, H.** (1994). Regulation of scute function by extramacrochaete in vitro and in vivo. *Development* 120, 3595-3603.
- Cabrera, C. V., and Alonso, M. C.** (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *Embo J* 10, 2965-2973.
- Campuzano, S.** (2001). Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development. *Oncogene* 20, 8299-8307.
- Campuzano, S., Carramolino, L., Cabrera, C. V., Ruiz-Gomez, M., Villares, R., Boronat, A., and Modolell, J.** (1985). Molecular genetics of the achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* 40, 327-338.
- Campuzano, S., and Modolell, J.** (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends in Genetics* 8, 202-208.
- Carroll, S. B., and Whyte, J. S.** (1989). The role of the hairy gene during *Drosophila* morphogenesis: Stripes in imaginal discs. *Genes Dev* 3, 905-916.
- Caudy, M., Grell, E. H., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1988). The maternal sex determination gene daughterless has zygotic activity necessary for the formation of peripheral neurons in *Drosophila*. *Genes Dev* 2, 843-852.
- Cavodeassi, F., Modolell, J., and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development* 128, 2847-2855.
- Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P., and Haenlin, M.** (1997). *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during the formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 3083-3095.
- Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S., and Modolell, J.** (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev* 5, 996-1008.
- Cubas, P., and Modolell, J.** (1992). The extramacrochaetae gene provides information for sensory organ patterning. *The Embo Journal* 11, 3385-3393.
- Culi, J., and Modolell, J.** (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* 12, 2036-2047.
- de Celis, J., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S.** (1996). Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development* 122, 2719-2728.
- De Jossineau, C., Soule, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., and Alexandre, D.** (2003). Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*. *Nature* 426, 555-559.
- De Strooper, B.** (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.

- Dominguez, M., and Campuzano, S.** (1993). *asense*, a member of the *Drosophila* achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *Embo J* 12, 2049-2060.
- Ellis, H. M., Spann, D. R., and Posakony, J. W.** (1990). *extramacrochaetae*, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27-38.
- Furriols, M., and Bray, S.** (2000). Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function. *Dev Biol* 227, 520-532.
- García-Alonso, L. A., and Garcia-Bellido, A.** (1988). *extramacrochaetae*, a trans-acting gene of the *achaete-scute* complex of *Drosophila* involved in cell communication. *Roux's Arch Dev Biol* 197, 328-338.
- García-Bellido, A.** (1979). Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 91, 491-520.
- García-García, M. J., Romain, P., Simpson, P., and Modolell, J.** (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 126, 3523-3532.
- Garrell, J., and Campuzano, S.** (1991). The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioessays* 13, 493-498.
- Garrell, J., and Modolell, J.** (1990). The *Drosophila* *extramacrochaetae* locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61, 39-48.
- Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F.** (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584.
- Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K. A., and Delidakis, C.** (2003). Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* 130, 259-270.
- Golic, K. G., and Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499-509.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S., and Modolell, J.** (2003). Half a century of neural prepatterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci* 4, 587-598.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D., and Modolell, J.** (1996). *Araucan* and *caupolican*, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85, 95-105.
- Gomez-Skarmeta, J. L., and Modolell, J.** (1996). *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* 10, 2935-2945.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Rodriguez, I., Martinez, C., Culi, J., Ferres-Marco, D., Beamonte, D., and Modolell, J.** (1995). Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev* 9, 1869-1882.

- Gonzalez, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J., and Campuzano, S.** (1989). Molecular analysis of the asense gene, a member of the achaete-scute complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *Embo J* 8, 3553-3562.
- Gorlich, D., and Mattaj, I. W.** (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518.
- Goulding, S. E., zur Lage, P., and Jarman, A. P.** (2000). amos, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by lozenge. *Neuron* 25, 69-78.
- Gowan, K., Helms, A. W., Hunsaker, T. L., Collisson, T., Ebert, P. J., Odom, R., and Johnson, J. E.** (2001). Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* 31, 219-232.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645-4649.
- Grens, A., Mason, E., Marsh, J. L., and Bode, H. R.** (1995). Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the Hydra achaete-scute homolog has proneural activity in *Drosophila*. *Development* 121, 4027-4035.
- Gupta, B. P., and Rodrigues, V.** (1997). Atonal is a proneural gene for a subset of olfactory sense organs in *Drosophila*. *Genes Cells* 2, 225-233.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P., and Romain, P.** (1997). Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 3096-3108.
- Hartenstein, V., and Posakony, J. W.** (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405.
- Hartenstein, V., and Posakony, J. W.** (1990). A dual function of the Notch gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev Biol* 142, 13-30.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P.** (1996a). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122, 161-171.
- Heitzler, P., Haenlin, M., Romain, P., Calleja, M., and Simpson, P.** (1996b). A Genetic Analysis of pannier, a Gene Necessary for Viability of Dorsal Tissues and Bristle Positioning in *Drosophila*. *Genetics* 143, 1271-1286.
- Heitzler, P., Vanolst, L., Biryukova, I., and Romain, P.** (2003). Enhancer-promoter communication mediated by Chip during Pannier-driven proneural patterning is regulated by Osa. *Genes Dev* 17, 591-596.
- Hinz, U., Giebel, B., and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76, 77-87.

- Hu, X., Lee, E. C., and Baker, N. E.** (1995). Molecular analysis of scabrous mutant alleles from *Drosophila melanogaster* indicates a secreted protein with two functional domains. *Genetics* 141, 607-617.
- Huang, F., Dambly-Chaudiere, C., and Ghysen, A.** (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1087-1095.
- Huang, M. L., Hsu, C. H., and Chien, C. T.** (2000). The proneural gene *amos* promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron* 25, 57-67.
- Ish-Horowicz, D., and Burke, J. F.** (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9, 2989-2998.
- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A., and Schneuwly, S.** (1997). GAL4-responsive UAS-*tau* as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell Tissue Res* 290, 1-10.
- Jafar-Nejad, H., Acar, M., Nolo, R., Lacin, H., Pan, H., Parkhurst, S. M., and Bellen, H. J.** (2003). *Senseless* acts as a binary switch during sensory organ precursor selection. *Genes Dev* 17, 2966-2978.
- Jan, Y. N., and Jan, L. Y.** (1994). Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu Rev Genet* 28, 373-393.
- Jarman, A. P., and Ahmed, I.** (1998). The specificity of proneural genes in determining *Drosophila* sense organ identity. *Mech Dev* 76, 117-125.
- Jarman, A. P., Brand, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1993a). The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* 119, 19-29.
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1993b). *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73, 1307-1321.
- Jarman, A. P., Grell, E. H., Ackerman, L., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1994). *Atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 369, 398-400.
- Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1995). Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121, 2019-2030.
- Kaspar, M.** (2000). Untersuchungen zum mitotischen Abbau von Cyclin A in *Drosophila melanogaster*. (Diplomarbeit)
- Kehl, B., Cho, K., and Choi, K.** (1998). *mirror*, a *Drosophila* homeobox gene in the Iroquois complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* 125, 1217-1227.
- Klein, T., and Campos-Ortega, J. A.** (1997). *klumpfuß*, a *Drosophila* gene encoding a member of the EGR family of transcription factors, is involved in bristle and leg development. *Development* 124, 3123-3134.

- Klein, T., Seugnet, L., Haenlin, M., and Martinez Arias, A.** (2000). Two different activities of Suppressor of Hairless during wing development in *Drosophila*. *Development* 127, 3553-3566.
- Koelzer, S., and Klein, T.** (2003). A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*. *Development* 130, 1973-1988.
- Kopan, R., and Goate, A.** (2000). A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer's disease. *Genes Dev* 14, 2799-2806.
- Kunisch, M., Haenlin, M., and Campos-Ortega, J. A.** (1994). Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene delta is enhanced by proneural proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10139-10143.
- Lai, E. C.** (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3, 840-845.
- Lai, E. C.** (2003). *Drosophila* tufted is a gain-of-function allele of the proneural gene amos. *Genetics* 163, 1413-1425.
- Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973.
- Lecourtois, M., and Schweisguth, F.** (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* 9, 2598-2608.
- Lee, J. E.** (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7, 13-20.
- Lee, T., and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22, 451-461.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W.** (2002). kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16, 209-221.
- Lindsley, D. L., and Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. (San Diego, Academic Press)
- Little, M., Holmes, G., and Walsh, P.** (1999). WT1: what has the last decade told us? *Bioessays* 21, 191-202.
- Little, M., and Wells, C.** (1997). A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 9, 209-225.
- Madden, S. L., and Rauscher, F. J., 3rd** (1993). Positive and negative regulation of transcription and cell growth mediated by the EGR family of zinc-finger gene products. *Ann N Y Acad Sci* 684, 75-84.
- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., and Haber, D. A.** (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 9, 2143-2156.

- Martinez, C., and Modolell, J.** (1991). Cross-regulatory interactions between the proneural achaete and scute genes of *Drosophila*. *Science* 251, 1485-1487.
- Martinez, C., Modolell, J., and Garrell, J.** (1993). Regulation of the proneural gene achaete by helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 13, 3514-3521.
- Mlodzik, M., Baker, N. E., and Rubin, G. M.** (1990). Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* 4, 1848-1861.
- Modolell, J.** (1997). Patterning of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Perspect Dev Neurobiol* 4, 285-296.
- Modolell, J., and Campuzano, S.** (1998). The achaete-scute complex as an integrating device. *The International Journal of Developmental Biology* 42, 275-282.
- Morel, V., and Schweisguth, F.** (2000). Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 14, 377-388.
- Moscoso del Prado, J., and Garcia-Bellido, A.** (1984a). Cell interactions in the generation of chaetae pattern in *Drosophila*. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 246-251.
- Moscoso del Prado, J., and Garcia-Bellido, A.** (1984b). Genetic regulation of the Achaete-scute complex of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 242-245.
- Mullins, M. C., Rio, D. C., and Rubin, G. M.** (1989). cis-acting DNA sequence requirements for P-element transposition. *Genes Dev* 3, 729-738.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J., and Guerrero, I.** (1997). Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* 124, 1227-1237.
- Murre, C., McCaw, P. S., and Baltimore, D.** (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Netzer, C., Rieger, L., Brero, A., Zhang, C. D., Hinzke, M., Kohlhase, J., and Bohlander, S. K.** (2001). SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Hum Mol Genet* 10, 3017-3024.
- Nolo, R., Abbott, L. A., and Bellen, H. J.** (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102, 349-362.
- O'Donovan, K. J., Tourtellotte, W. G., Millbrandt, J., and Baraban, J. M.** (1999). The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends in Neurosciences* 22, 167-173.
- Oellers, N., Dehio, M., and Knust, E.** (1994). bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol Gen Genet* 244, 465-473.
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I., and Caudy, M.** (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* 8, 2743-2755.



- Paroush, Z., Finley, R. L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R., and Ish-Horowicz, D.** (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79, 805-815.
- Phillips, R. G., and Whittle, J. R.** (1993). wingless expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development* 118, 427-438.
- Ramain, P., Khechumian, R., Khechumian, K., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P.** (2000). Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning. *Mol Cell* 6, 781-790.
- Renaud, O., and Simpson, P.** (2001). scabrous modifies epithelial cell adhesion and extends the range of lateral signalling during development of the spaced bristle pattern in *Drosophila*. *Dev Biol* 240, 361-376.
- Reynolds, P. A., Smolen, G. A., Palmer, R. E., Sgroi, D., Yajnik, V., Gerald, W. L., and Haber, D. A.** (2003). Identification of a DNA-binding site and transcriptional target for the EWS-WT1(+KTS) oncoprotein. *Genes Dev* 17, 2094-2107.
- Roberts, D. B.** (1998). *Drosophila : a practical approach*, 2nd edn. (Oxford University Press)
- Rodriguez, I., Hernandez, R., Modolell, J., and Ruiz-Gomez, M.** (1990). Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *Embo J* 9, 3583-3592.
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. R., and Modolell, J.** (1989). Expression of achaete and scute genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev* 3, 997-1007.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.
- Rusconi, J. C., Fink, J. L., and Cagan, R.** (2004). klumpfuss regulates cell death in the *Drosophila* retina. *Mech Dev* 121, 537-546.
- Rushlow, C. A., Hogan, A., Pinchin, S. M., Howe, K. M., Lardelli, M., and Ish-Horowicz, D.** (1989). The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *Embo J* 8, 3095-3103.
- Sato, M., Kojima, T., Michiue, T., and Saigo, K.** (1999). Bar homeobox genes are latitudinal prepattern genes in the developing *Drosophila* notum whose expression is regulated by the concerted functions of decapentaplegic and wingless. *Development* 126, 1457-1466.
- Schweisguth, F.** (2004). Notch signaling activity. *Curr Biol* 14, R129-138.
- Simpson, P., Woehl, R., and Usui, K.** (1999). The development and evolution of bristle patterns in Diptera. *Development* 126, 1349-1364.
- Singson, A., Leviten, M., Bang, A., Hua, X., and Posakony, J.** (1994). Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev* 8, 2058-2071.

- Skeath, J. B., and Carroll, S. B.** (1991). Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* 5, 984-995.
- Stemmer, W. P.** (1991). A 20-minute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmid DNA. *Biotechniques* 10, 726.
- Stern, C.** (1954). Two or three bristles. *Am Sci* 42, 213-247.
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M., and Ueno, N.** (1998). Role of dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125, 4215-4224.
- Usui, K., and Kimura, K. I.** (1993). Sequential emergence of the evenly spaced microchaetes on the notum of *Drosophila*. *Roux Arch Dev Biol* 203, 151-158.
- Van Doren, M., Bailey, A. M., Esnayra, J., Ede, K., and Posakony, J. W.** (1994). Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev* 8, 2729-2742.
- Van Doren, M., Ellis, H. M., and Posakony, J. W.** (1991). The *Drosophila* extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. *Development* 113, 245-255.
- Van Doren, M., Powell, P. A., Pasternak, D., Singson, A., and Posakony, J. W.** (1992). Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross- activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae. *Genes Dev* 6, 2592-2605.
- Villa-Cuesta, E., de Navascues, J., Ruiz-Gomez, M., del Corral, R. D., Dominguez, M., de Celis, J. F., and Modolell, J.** (2003). Tufted Is a Gain-of-Function Allele That Promotes Ectopic Expression of the Proneural Gene amos in *Drosophila*. *Genetics* 163, 1403-1412.
- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A., and Carroll, S.** (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev* 12, 1474-1482.
- White, R. A., and Wilcox, M.** (1984). Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* 39, 163-171.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenon, A. R., Connolly, M. L., and Lerner, R. A.** (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37, 767-778.
- Wilson, P. A., and Hemmati-Brivanlou, A.** (1997). Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron* 18, 699-710.
- Xu, T., and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-1237.
- Yang, X., Bahri, S., Klein, T., and Chia, W.** (1997). Klumpfuss, a putative *Drosophila* zinc finger transcription factor, acts to differentiate between the identities of two secondary precursor cells within one neuroblast lineage. *Genes Dev* 11, 1396-1408.
- zur Lage, P. I., Prentice, D. R., Holohan, E. E., and Jarman, A. P.** (2003). The *Drosophila* proneural gene amos promotes olfactory sensillum formation and suppresses bristle formation. *Development* 130, 4683-4693.

## 6. Zusammenfassung

Für das Verständnis der Musterbildung in dem peripheren Nervensystem (PNS) von *Drosophila* ist es wichtig, die Prozesse zu kennen, die zur Selektion der sensorischen Vorläuferzellen (SOPs) und Bildung der mechanosensorischen Borsten führen. Durch vorangegangene Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors *klumpfuss* (*klu*) für die Borstenentwicklung bei *Drosophila* benötigt wird. Ein Ausfall der Genfunktion führt zu einem milden Verlust sensorischer Borsten, der darauf beruht, dass nur noch eine reduzierte Anzahl an SOPs gebildet wird (Klein und Campos-Ortega, 1997). Diese Beobachtungen führten zu der Frage, welche Funktion Klu bei der Entwicklung des PNS von *Drosophila* besitzt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *klu* an einem Entscheidungsprozess beteiligt ist, der festlegt, ob sich eine Zelle zu einer neuronalen Vorläuferzelle (SOP) entwickelt oder ob diese Zelle ein ektodermales Schicksal annimmt. Belegt werden konnte dies anhand einer Überexpressionsstudie von *klu*, die zeigte, dass lediglich eine Erhöhung der Klu-Konzentration in den Zellen ausreicht, um die Bildung ektopischer SOPs zu induzieren.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass *klu* selbst kein proneurales Gen ist. Vielmehr scheint Klu die SOP Bildung dadurch zu beeinflussen, dass es die in den Zellen vorhandene proneurale Aktivität erhöht. Mit Hilfe von Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass Klu als Repressor agiert. Die Überexpression eines konstitutiv aktiven Repressorfusionsproteins in dem der C-terminale Teil von Klu mit der Repressordomäne des Engrailed Proteins verknüpft war, führte zu einem qualitativ gleichen Phänotyp wie die Überexpression von *klu*. Anhand einer Funktionsstrukturanalyse des Klu-Proteins konnte zudem gezeigt werden, dass der N-terminale Teil von Klu benötigt wird, um mit anderen, für die SOP-Bildung ebenfalls wichtigen Proteinen, zu interagieren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten erlauben es, ein Modell für die Funktionsweise von Klu zu entwickeln. In diesem Modell ist Klu Teil eines Repressorkomplexes, der die Expression mehrerer Gene supprimiert. Diese Gene kodieren für Antagonisten bzw. Repressoren der neuralen Entwicklung. Einer dieser Antagonisten ist vermutlich *extramacrochaetae* (*emc*). Das Modell beschreibt einen doppelt-negativen Regulationsmechanismus, der letztendlich die in einer Zelle vorhandene Konzentration proneuraler Antagonisten bestimmt und dadurch die proneurale Aktivität reguliert. Die Expressionsstärke von *klu* definiert demnach einen Schwellenwert für die proneurale Aktivität, der überschritten werden muss, damit eine Zelle das neuronale Schicksal annehmen kann.

## 7. Abstract

To understand the patterning mechanisms of the peripheral nerve system (PNS) in *Drosophila*, it is important to know the processes leading to the determination of the sensory organ precursors (SOPs) and the development of the mechanosensory bristles. Previous studies showed that the zinc finger transcription factor *klumpfuss* (*klu*) is required for the development of the sensory bristles in *Drosophila*. A loss of function mutation leads to a mild loss of sensory bristles as a result of a reduced formation of SOPs (Klein and Campos-Ortega, 1997). These observations led to speculations about the function of Klu during the development of the PNS in *Drosophila*.

The presented data showed that *klu* is involved in a selection process which defines the either neural (SOP) or ectodermal cell fate. An overexpression analysis proved that a simple increase of the Klu concentration in cells is sufficient to induce the determination of ectopic SOPs. However, it was shown that *klu* is not a proneural gene by itself. More likely, Klu seems to influence the SOP formation by increasing the present proneural activity within the cells. Using fusion proteins revealed that Klu acts as a repressor. Overexpression of a constitutively active repressor fusion protein in which the C-terminal part of *klu* was fused to the engrailed repressor domain led to a qualitatively similar phenotype as the overexpression phenotype of *klu*. In addition, a functional and structural analysis showed that the N-terminal part of Klu is required for the interaction with other proteins relevant for SOP formation.

The data obtained in this study allows to develop a model of Klu function. In this model Klu is part of a repressor complex suppressing the expression of several genes. These genes encode for antagonists or repressors of neural development. Most likely, one of the antagonists is *extramacrochaetae* (*emc*). The model describes a double negative regulation determining the concentration of proneural antagonists in cells and by this means regulating the proneural activity. Accordingly, the expression level of *klu* defines a threshold for proneural activity. Crossing this level allows a cell to adopt the neural fate.

## 8. Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Amp	Ampicillin
As.	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	centi
cDNA	von gespleißter RNA revers transkribierte DNA
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
E <sub>x</sub>	Extinktion bei Wellenlänge x nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bisaminoethoxyethantetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
HAc	Essigsäure
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kann	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m	milli
M	Mol pro Liter
μ	mikro
MARCM	mosaic analysis with a repressible cell marker
max.	maximal
MeOH	Methanol
min	Minuten
mm	Millimeter
mol	molar
mRNA	Boten-RNA
n	nano
NGS	normales Ziegenserum
OD	optische Dichte
p	pico
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
Std.	Stunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzym-Einheiten

Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumenanteile
x	-fach
%	Prozent
°C	Grad Celsius
∅	Durchmesser
↑	Höhe

## 9. Danksagung

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Genetik der Universität zu Köln im Labor von Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein für die Überlassung des Themas, für seine stete Unterstützung und ständige Bereitschaft zur kritischen Diskussion, aber auch für das Gewähren von Freiräumen. Ich möchte ihm auch dafür danken, dass er mir die Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen ermöglicht hat.

Frau Prof. Dr. Maria Leptin danke ich für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth möchte ich dafür danken, dass er den Vorsitz bei der Disputation übernimmt.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Klein, Sprenger und Leptin für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Bereitschaft zur Diskussion und Problemlösung. Frau Hannelore Wirges-Koch danke ich dafür, dass sie meine Stammsammlung umsorgt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kollegen und Freund Axel Dienemann für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Durch die gegenseitige Unterstützung war es möglich, so manche Klippe im Laboralltag zu umschiffen. An unsere gemeinsame Zeit, werde ich immer gerne zurückdenken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Mein ganz persönlicher Dank gilt Sigrid, die mich mit viel Verständnis immer liebevoll und tatkräftig unterstützte.

## 10. Erklärung

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

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein betreut worden.

Teilpublikationen: keine

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln den 22.03.2005

Markus Kaspar



## 11. Lebenslauf

<b>Name:</b>	Markus Kaspar
<b>Geburtsdatum/-ort:</b>	31.03.1971 in Troisdorf
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schule und Wehrdienst:</b>	
1977-1981	Kath. Grundschule in Troisdorf
1981-1991	Städt. Gymnasium Zum Altenforst in Troisdorf Abschluss: allgemeine Hochschulreife
1991-1992	Wehrdienst im Wachbatallion in Siegburg
<b>Studium:</b>	
1992-2000	Diplomstudium Biologie an der Universität zu Köln
08/1996	Vordiplom
01/1999	Diplomprüfung in den Fächern: Genetik (Hauptfach), Entwicklungsbiologie, Biochemie
02/1999-04/2000	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Maria Leptin. Titel: „Untersuchungen zum mitotischen Abbau von Cyclin A in <i>Drosophila melanogaster</i> “
<b>Promotion:</b>	
01/2001-02/2005	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Klein mit dem Titel: „Charakterisierung der Funktion des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors <i>klumpfuss</i> während der Entwicklung des peripheren Nervensystems bei <i>Drosophila melanogaster</i> “.
<b>Berufliche Tätigkeit:</b>	
02/1999-04/2000	Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität zu Köln
05/2000-04/2001	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität zu Köln
Seit 05/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Universität zu Köln
Köln, März 2005	