

Die Transkriptions-Regulation des EGFR-Zielgens *pipe*
und
Analyse der KASH- und der SUN-Domänen-Proteine
in der Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martin Technau

aus Wermelskirchen

Köln, 2007

Berichtersteller/in:

Prof. Dr. Siegfried Roth
Prof. Dr. Maria Leptin

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen:.....	1
TEIL 1: DIE TRANSKRIPTIONS-REGULATION DES EGFR-ZIELGENS <i>PIPE</i> IN DER OOGENESE VON <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	1
1.1 Einleitung	1
1.1.1 Transkriptionsregulation bei Eukaryonten.....	1
1.1.2 Bioinformatische Identifizierung potentieller <i>cis</i> -regulatorischer Motive.....	2
1.1.3 <i>Drosophila</i> -Oogenese.....	4
1.1.4 Festlegung der Körperachsen während der Oogenese.....	5
1.1.5 Der EGFR-Signalweg.....	6
1.1.6 Die dorsoventrale Musterbildung des Embryos.....	7
1.1.7 Das <i>pipe</i> -Gen.....	7
1.1.8 Die Regulation der <i>pipe</i> -Expression in Ovarien.....	8
1.1.9 Ziele der Arbeit (1).....	10
1.2 Ergebnisse	11
1.2.1 Klonale Analyse von Kandidaten-Transkriptionsregulatoren.....	11
1.2.1.1 Die ETS-Transkriptionsfaktoren Pointed und Yan spielen keine Rolle bei der Regulation der <i>pipe</i> -Expression.....	11
1.2.1.2 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Tramtrack hat keinen Einfluss auf die <i>pipe</i> -Expression.....	13
1.2.1.3 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor CF2 spielt keine Rolle bei der Regulation der <i>pipe</i> -Expression.....	14
1.2.1.4 Der HMG-Box-Transkriptionsfaktor Capicua wirkt als essentieller Aktivator der <i>pipe</i> -Expression.....	15
1.2.1.5 Der Verlust der globalen Corepressoren Groucho oder CtBP führt zu keiner Veränderung des <i>pipe</i> -Expressionsmusters.....	17
1.2.1.6 Der Dpp-Signalweg ist nicht in die Regulation der <i>pipe</i> -Expression involviert.....	19
1.2.2 Bioinformatische Analyse der <i>cis</i> -regulatorischen Region von <i>pipe</i>	21
1.2.2.1 Phylogenetic Footprinting mit Hilfe unterschiedlicher Alignment-Software.....	22
1.2.2.2 Lwf-Scan: Vorhersage potentieller <i>cis</i> -regulatorischer Module (CRM).....	25
1.2.2.3 Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindemotive mit Hilfe von <i>ab initio</i> -Vorhersage-Programmen.....	26
1.2.2.4 Auswertung und Vergleich der TFBS-Vorhersage-Programme.....	28
1.2.3 Einengung des <i>cis</i> -regulatorischen Bereichs mittels terminal deletierter Reportergen-Konstrukte.....	34
1.2.4 Test vorhergesagter TFBS durch intern deletierte/mutierte Reportergen-Konstrukte.....	39
1.2.5 Auswertung der Bioinformatik-Analyse und der Reportergen-Konstrukte: Identifizierung einer Repressorbindestelle.....	42
1.2.6 Experimente zur Isolierung von an das identifizierte <i>cis</i> -regulatorische Motiv bindenden Transkriptionsfaktoren.....	44
1.2.6.1 Yeast One-Hybrid screen.....	44
1.2.6.2 Analyse der im Yeast One-Hybrid screen identifizierten Kandidatengene.....	46
1.2.6.3 Gelretardations-Experimente (EMSA) mit Protein-Extrakt aus Ovarien.....	48

1.3	Diskussion	51
1.3.1	Die dorsale Repression von <i>pipe</i> wird durch einen bisher nicht charakterisierten EGFR-regulierten Transkriptionsfaktor gesteuert	51
1.3.2	Die <i>cis</i> -regulatorische Region von <i>pipe</i> ist modular aufgebaut	53
1.3.3	Eine kompetitive Bindung von Aktivatoren und Repressoren an das identifizierte Bindemotiv kann ausgeschlossen werden	54
1.3.4	Sekundäre Signalwege spielen bei der dorsalen Repression von <i>pipe</i> keine entscheidende Rolle	55
1.3.5	Die identifizierte Repressor-Bindestelle ermöglicht die Isolierung des <i>pipe</i> -Repressors mittels biochemischer Methoden	56
1.3.6	Die funktionell relevanten Bereiche der <i>pipe</i> -upstream-Region sind evolutionär hoch konserviert	57
1.3.7	Die evolutionäre Konservierung von <i>pipe</i>	58
 TEIL 2: ANALYSE DER KASH- UND DER SUN-DOMÄNEN-PROTEINE IN DER OOGENESE VON <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>		61
2.1	Einleitung	61
2.1.1	Die Rolle der KASH- Proteine bei der Wanderung und Verankerung von Zellkernen	62
2.1.2	<i>Drosophila</i> Msp-300	63
2.1.3	<i>Drosophila</i> Klarsicht	64
2.1.4	Die Funktion von SUN-Domänen-Proteinen bei der Kernlokalisierung der KASH-Domänen-Proteine	65
2.1.5	Ziele der Arbeit (2)	67
2.2	Ergebnisse	68
2.2.1	Die Expression von Msp-300 und Klarsicht während der Oogenese	68
2.2.2	Die KASH-Domäne von Msp-300 lokalisiert an der Kernmembran	69
2.2.3	Keimbahnklone des Allels <i>Msp-300^{sz75}</i> führen zu einem Defekt des Nährzell-Dumpings	71
2.2.4	Generierung molekular definierter Deletionen des <i>Msp-300</i> -Locus	74
2.2.5	Der Dumping-Defekt wird nicht durch den Funktionsverlust von <i>Msp-300</i> verursacht	76
2.2.6	Msp-300 und Klar haben keine essentielle Funktion in der Oogenese	77
2.2.7	<i>Msp-300</i> -defiziente Fliegen sterben im ersten Larvenstadium	79
2.2.8	Die Kernmorphologie während der frühen Embryogenese wird durch den Verlust von <i>Msp-300</i> und <i>klar</i> nicht verändert	80
2.2.9	Versuche zur Identifizierung der <i>sz75</i> Dumping-Mutation	81
2.2.10	Deletion des <i>Drosophila</i> SUN-Domänen-Homologs <i>CG18584/CG3287</i>	82
2.2.11	In <i>CG3287/CG18584</i> -defizienten Eikammern unterbleibt die Kernhüllen-Lokalisation von Msp-300 und Klar	83
2.3	Diskussion	85
2.3.1	<i>Drosophila</i> KASH-Domänen-Proteine haben keine Funktion in der Oogenese	85
2.3.2	Die Kernhüllen-Lokalisation von Msp-300 und Klar basiert auf der Interaktion der KASH-Domäne mit dem SUN-Domänen-Protein <i>CG3287/CG18584</i>	86
2.3.3	Die essentielle Funktion von Msp-300 besteht möglicherweise nicht in der Kernpositionierung	88
2.3.4	Der in <i>Msp-300^{sz75}</i> -mutanten Eikammern beobachtete Dumping-Phänotyp	90

3	MATERIAL UND METHODEN	92
3.1	Materialien	92
3.1.1	Allgemeine Reagenzien und Ausrüstung	92
3.1.2	<i>Drosophila melanogaster</i> Fliegenstämme	92
3.1.3	Antikörper und fluoreszente Marker	96
3.1.4	Oligonukluotide / PCR-Primer	97
3.1.5	Plasmide	107
3.1.6	Software	107
3.1.7	Mikroskopie	107
3.2	Arbeiten mit Fliegen	108
3.2.1	Keimbahn Transformation	108
3.2.2	Genetische Mosaik-Analyse	108
3.2.3	Induktion von Keimbahnklonen unter Verwendung des FLP-DFS Systems	108
3.2.4	Herstellung gezielter Deletionen unter Verwendung von <i>Exelixis</i> XP-, WH- und RB- Transposon-Insertionen	109
3.2.5	Rekombination von Mutationen/Deletionen auf FRT-Chromosomen	109
3.2.6	Rettung der <i>Msp-300</i> -Deletionen und Versuch der Rettung des Dumping-Phänotyps des <i>Msp-300^{sz75}</i> -Allels	110
3.2.7	Defizienz-Kartierung der Dumping-Mutation auf dem <i>Msp-300^{sz75}</i> -Chromosom	110
3.2.8	Komplementationstest des <i>Msp-300^{sz75}</i> -Chromosoms gegen bekannte Dumping-Mutanten	111
3.2.9	Analyse des Fressverhaltens <i>Msp-300</i> -mutanter Larven	111
3.2.10	Analyse des larvalen Muskelsystems in polarisiertem Licht	111
3.2.11	Anfertigung von Eihüllen-Präparaten und embryonalen Kutikula-Präparaten	111
3.2.12	Antikörper-Färbung und <i>in-situ</i> -Hybridisierung	112
3.2.12.1	Fixierung von Embryonen für Antikörper-Färbungen	112
3.2.12.2	Fixierung von Ovarien für Antikörper-Färbungen und <i>in-situ</i> -Hybridisierungen	112
3.2.12.3	Antikörper-Färbung von Embryonen	112
3.2.12.4	Antikörper-Färbung von Ovarien	113
3.2.12.5	Phalloidin-Färbung von Ovarien zur Visualisierung der Nährzell-Aktin-Bündel	113
3.2.12.6	Antikörperfärbung von Imaginalscheiben	113
3.2.12.7	<i>In-situ</i> -Hybridisierung von Ovarien	113
3.2.12.8	Fluoreszente <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Ovarien	114
3.2.13	Extraktion genomischer DNA aus adulten Fliegen	114
3.3	Molekularbiologische Arbeiten	115
3.3.1	Klonierungsarbeiten	115
3.3.1.1	Klonierung der <i>pipe</i> -Reportergen-Konstrukte	115
3.3.1.2	Klonierung von <i>pipe</i> -rescue und uniform exprimierenden <i>pipe-ST2</i> Konstrukten	116
3.3.1.3	Klonierung von GFP-Fusionsproteinen	117
	Klonierung des Reportervektors für den Yeast One-Hybrid screen	117
3.3.2	Sequenzierung und Verarbeitung der Sequenzdaten	117
3.3.3	Sequenzierung des <i>Msp-300^{sz75}</i> -Allels	118
3.4	Gelelektrophorese von Proteinen	118
3.4.1	Untersuchung der DNA-Bindungsaffinität von Proteinen in Gelretardationsexperimenten	118
3.4.2	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	118
3.5	Gelretardationsexperimente (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)	119
3.5.1	In vitro Translation mit Kaninchen-Retikulozytenlysat oder Weizenkeim-Extrakt	119

3.5.2	Herstellung von radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonucleotiden	120
3.5.3	Herstellung von Ovarien-Proteinextrakt („crude tissue extract“)	120
3.5.4	Dimerisierung und DNA-Bindung der Kandidaten-Transkriptions-faktoren	120
3.6	Herstellung einer Ovarien-spezifischen cDNA-Bibliothek und Durchführung eines Yeast One-Hybrid screens	121
3.6.1	Synthese des target-Elements und Klonierung in den pHIS2 Vektor	121
3.6.2	Ermittlung der Hintergrund HIS3 Expression	121
3.6.3	Herstellung kompetenter Hefe-Zellen nach der LiAc-Methode	121
3.6.4	Generierung einer Ovarien cDNA Bibliothek	121
3.6.5	Identifizierung der positiven cDNA Inserts	122
3.6.6	Isolierung der cDNA-Insert-pGADT7-Rec[2]-Plasmide (Bait-Plasmide)	122
3.7	Identifizierung <i>cis</i>-regulatorischer Elemente mit Hilfe von Bioinformatik-Software	122
4	LITERATURVERZEICHNIS	124
5	ANHANG	142
5.1	Ergebnisse der Alignment-Programme bayes aligner und ClustalW	142
5.2	Ausführliche Darstellung der TFBS-Vorhersage-Programme	145
 Zusammenfassung		 151
Abstract		152
Danksagungen		153
Erklärung		154
Lebenslauf		155

Abkürzungen:

AP	anterioposterior
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
β-Gal	β-Galactosidase
BSA	Rinderserumalbumin
Cic	Capicua
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CF2	Chorion factor 2
CRM	<i>cis</i> -regulatorisches Modul
CtBP	C-terminal binding protein
<i>D. anan.</i>	<i>Drosophila ananassae</i>
DAPI	4, 6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid
<i>D. erect.</i>	<i>Drosophila erecta</i>
<i>D. gri.</i>	<i>Drosophila grimshawi</i>
DIG	Digoxigenin
<i>D. mel.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. moj.</i>	<i>Drosophila mojavensis</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
<i>D. per.</i>	<i>Drosophila persimilis</i>
Dpp	Decapentaplegic
<i>D. pseu.</i>	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
<i>D. sim.</i>	<i>Drosophila similis</i>
<i>D. sech.</i>	<i>Drosophila sechellia</i>
DTT	Dithiothreitol
DV	dorsoventral
<i>D. vir.</i>	<i>Drosophila virilis</i>
<i>D. wil.</i>	<i>Drosophila willistoni</i>
<i>D. yak.</i>	<i>Drosophila yakuba</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Expectation-Maximization
EMS	Ethylmethylsulfat
EMSA	electrophoretic mobility-shift assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	expressed sequence tag

EtOH	Ethanol
GFP	green fluorescent protein
Grk	Gurken
Gro	Groucho
GTM	generelle Transkriptionsmaschinerie
GS	<i>goat</i> -(Ziegen)-Serum
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HIS	Histidinsynthase
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
KASH	Klarsicht/ANC1/Syne-homology
kb	Kilobase
Klar	Klarsicht
<i>LacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
Leu	Leucin
Med	Medea
MLG	Mittelliniengliazellen
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleosid-Triphosphate
Msp-300	muscle specific protein 300
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pBS	pBluescript ^R -Vektor (<i>Stratagene</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pnt	Pointed
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SUN	Sad1/UNC84
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindestelle
Tkv	Thickveins
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ttk	Tramtrack
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UTR	untranslatierter Bereich
WT	Wildtyp

Teil 1: Die Transkriptions-Regulation des EGFR-Zielgens

pipe in der Oogenese von *Drosophila melanogaster*

1.1 Einleitung

1.1.1 Transkriptionsregulation bei Eukaryonten

Als Folge der Sequenzierung diverser tierischer Genome hat sich gezeigt, dass im Durchschnitt die Anzahl der Gene bei Vertebraten nur ungefähr doppelt so hoch ist, wie bei Invertebraten. Diese zunächst überraschende Entdeckung war ein erster wichtiger Hinweis darauf, dass vor allem Unterschiede in der Regulation der Genexpression für die Vielfalt der Organismen und insbesondere für die größere Komplexität höherer Lebewesen verantwortlich sind und nicht ein größeres Repertoire unterschiedlicher Gene. Tatsächlich sind die Mechanismen der eukaryotischen Genregulation weitaus komplexer, als bei prokaryotischen Organismen, bei denen das klassische Operon-Modell eine vergleichbar einfache Erklärung für die Funktion der Genexpression auf molekularer Ebene lieferte (Jacob et al., 1960; Levine and Tjian, 2003).

Eine zentrale Funktion bei der Transkriptionsregulation in Eukaryoten haben Transkriptionsfaktoren, die an spezifische *cis*-regulatorische Motive (Transkriptionsfaktor-Bindestellen, TFBS) binden, die in einem sehr variablen Abstand, sowohl proximal als auch distal zur Transkriptions-Initiationsstelle vorkommen können (Arnosti, 2003; Barolo and Posakony, 2002; Lee and Young, 2000). Benachbarte TFBS sind häufig in Form von *cis*-regulatorischen Modulen (CRM) organisiert. Die kombinatorische Wirkung verschiedener, an einem CRM gebundener Transkriptionsfaktoren ist für das resultierende Expressionsmuster in bestimmten Geweben oder Zellen verantwortlich (Arnosti, 2002). CRMs werden auch als Enhancer bezeichnet, obwohl Transkriptionsfaktoren sowohl als positive (Aktivatoren), als auch als negative (Repressoren) Regulatoren der Transkription fungieren (Blackwood and Kadonaga, 1998; Gaston and Jayaraman, 2003; Gray and Levine, 1996b). Oft wird der gesamte *cis*-regulatorische Bereich eines Gens als Promotor bezeichnet und die direkte Region (~100 bp) um die Transkriptions-Initiationsstelle als Kern-Promotor oder basaler Promotor. Transkriptions-Cofaktoren interagieren mit den DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren und der am Kern-Promotor gebundenen, generellen Transkriptions-Maschinerie (Komplex aus RNA-Polymerase II und so genannten generellen Transkriptionsfaktoren) und bewirken so eine spezifische Regulation der Genexpression (Courey and Jia, 2001; Naar et al., 2001). Eine weitere wichtige Rolle spielt dabei außerdem die Organisation der Chromatin-Struktur, die vor allem über die Modifizierung von Histonen reguliert wird (z.B. Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung) (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000; Thiel et al., 2004).

1.1.2 Bioinformatische Identifizierung potentieller *cis*-regulatorischer Motive

Für die Vorhersage *cis*-regulatorischer Motive sind bioinformatische Methoden unerlässlich, eine verlässliche Identifizierung funktioneller Elemente stellt aber immer noch ein großes Problem dar, da regulatorische Sequenzen meist sehr kurz und hoch variabel sind. In den letzten Jahren sind jedoch erhebliche Fortschritte in diesem Zweig der Bioinformatik gemacht worden und zahlreiche, teils sehr unterschiedliche Programme, sind für diese Aufgabe entwickelt worden, die zum größten Teil über das Internet frei zugänglich sind. Vergleicht man die verschiedenen Methoden, nach denen diese Programme arbeiten, so lassen sich diese zunächst nach der Art des benötigten Inputs unterscheiden und in 2 Hauptgruppen einteilen (Elnitski et al., 2006; GuhaThakurta, 2006).

Bei der ersten Gruppe von Programmen muss eine TFBS bekannt sein und entweder als einfache Konsensussequenz, auch als DNA-Sequenz-Muster (sequence pattern) bezeichnet, oder in Form einer PWM (position weight matrix) vorliegen (GuhaThakurta, 2006; Harr et al., 1983; Stormo et al., 1982). Die Darstellung eines Motivs in Form einer PWM stellt dabei eine Verbesserung dar, da in diesem Fall die exakte Motiv-Variabilität mit einbezogen wird, indem die Häufigkeit jeder Base an jeder Position berücksichtigt wird, oder auch indem Nukleotiden, die in einem Motiv nicht vorkommen sollen, „Strafpunkte“ (penalties) zugewiesen werden. Da es nur für eine sehr begrenzte Zahl aller Transkriptionsfaktoren Informationen bezüglich der Sequenz der TFBS gibt (Roulet et al., 1998), lässt sich die Mehrzahl der tatsächlich vorkommenden Motive durch diese erste Gruppe von Programmen nicht identifizieren.

Einen alternativen Ansatz bieten Programme, die tatsächlich nur eine *cis*-regulatorische Sequenz als Input benötigen, in diesem Fall spricht man auch von einer „*ab initio*“ oder „*de novo*“ Motivsuche. Für die *ab initio*-Suche nach TFBS sind verschiedene Algorithmen entwickelt worden, die größtenteils nach „überrepräsentierten“ Mustern in der DNA suchen (Brazma et al., 1998; Bussemaker et al., 2000; van Helden et al., 1998). Beispiele für häufig verwendete Algorithmen sind der Greedy-Algorithmus (Hertz et al., 1990; Hertz and Stormo, 1999; Stormo and Hartzell, 1989), der EM-Algorithmus (expectation maximation) (Bailey and Elkan, 1995a; Cardon and Stormo, 1992; Lawrence and Reilly, 1990) und der Gibbs-Sampling Algorithmus (Lawrence et al., 1993). Obwohl in den letzten Jahren deutliche Fortschritte bei der Entwicklung neuer Methoden für die *ab initio* Identifizierung *cis*-regulatorischer Motiven gemacht worden sind, ist die Anzahl falsch positiver Vorhersagen sehr hoch (Jolly et al., 2005; Tompa et al., 2005).

Eine hilfreiche Methode zur Minimierung falsch positiver Vorhersagen, ist die Einbeziehung orthologer Sequenzen. Die steigende Zahl vollständig sequenzierter Genome hat zu einer vielfachen Anwendung komparativer Genomik bei der bioinformatischen Identifizierung von TFBS geführt (Dermitzakis and Clark, 2002; Emberly et al., 2003; Hong et al., 2003). Die Identifikation wichtiger biologischer Signale auf der Basis evolutionärer Konservierung, wird auch als phylogenetic footprinting bezeichnet (Duret and Bucher, 1997; Hardison et al., 1997; Tagle et al., 1988). Diese Methode basiert auf der Annahme, dass funktionale Elemente (zum Beispiel *cis*-regulatorische Motive) unter Selektionsdruck stehen und deshalb mit einer langsameren Rate evolvieren, als nicht funktionale Sequenzen. Eine als

phylogenetic shadowing bezeichnete Variante des phylogenetic footprinting verwendet insbesondere die homologen Sequenzen einer großen Zahl nahe verwandter Spezies (Boffelli et al., 2003). Da die Übergänge in den Verwandtschaftsgraden verschiedener Spezies fließend sind, und eine genaue Abgrenzung naher oder fern verwandter Arten daher schwierig ist, verwende ich im Folgenden nur den Ausdruck phylogenetic footprinting. In vielen Fällen hat die Berücksichtigung evolutionärer Konservierung tatsächlich zu einer nachweislichen Verbesserung bei der Identifizierung von TFBS geführt (Blanchette and Sinha, 2001; Frith et al., 2004; King et al., 2005; Loots et al., 2000; Sinha et al., 2004).

Inzwischen sind die Genome von 12 *Drosophila*-Spezies vollständig sequenziert ((Gilbert, 2007); <http://insects.eugenes.org/DroSpeGe/>), von evolutionär bis zu 40 Mio. Jahren entfernten Spezies (*D. mojavensis*, *D. virilis*, *D. grimshawi*), bis hin zu sehr nahe verwandten, nur wenige Mio. Jahre entfernten Arten (*D. simulans* und *D. sechellia*) (s. Abb. 1.1.1.). *Drosophila* ist damit besonders geeignet für bioinformatische Analysen, die auf der Methode des phylogenetic footprinting beruhen.

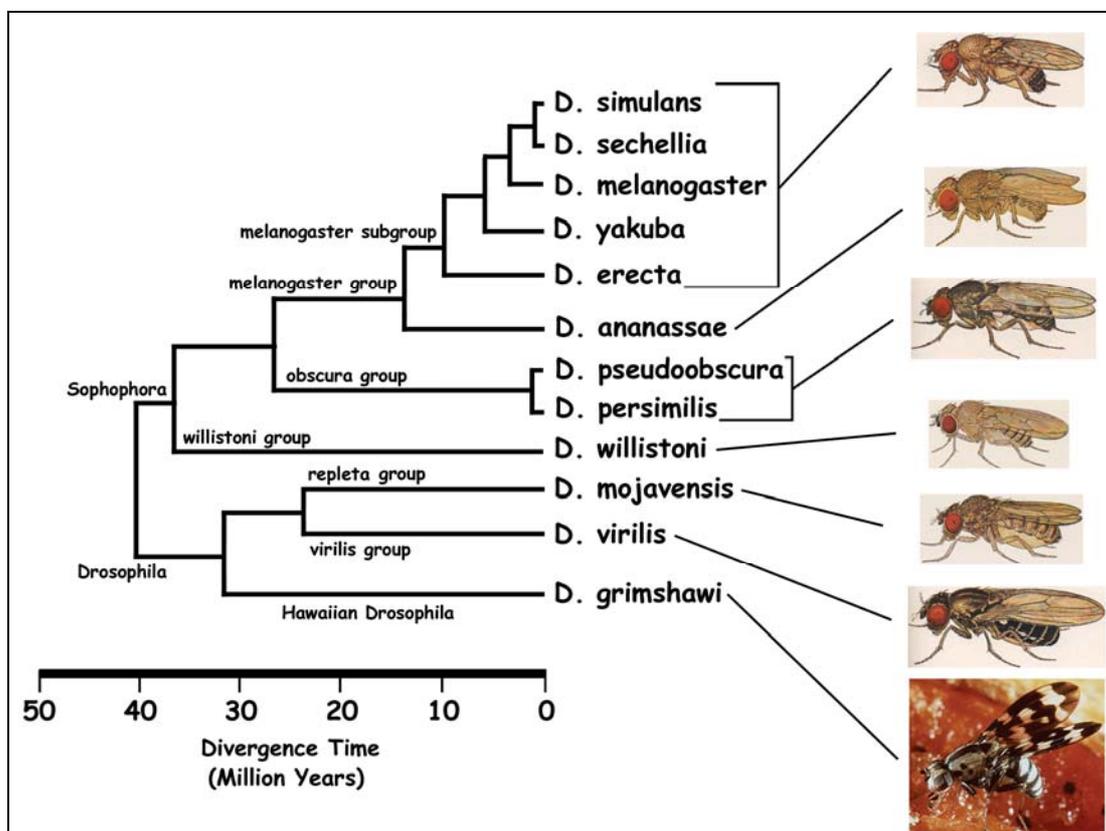


Abbildung 1.1.1.: Phylogenetischer Stammbaum der 12 vollständig sequenzierten *Drosophiliden* (aus: Crosby et al., 2007)

Für eine endgültige Validierung vorhergesagter TFBS sind experimentelle Daten immer noch unerlässlich (Vavouri and Elgar, 2005). Dabei hat sich insbesondere herausgestellt, dass die häufig beobachtete Bestätigung der Bindung von TF an vorhergesagte TFBS *in vitro* (Tronche et al., 1997) oft keine funktionale Relevanz besitzt. Die verlässlichste Möglichkeit zur Überprüfung der identifizierten TFBS in einem biologisch relevanten, gewebspezifischen Kontext, stellen *in vivo* Experimente dar, insbesondere die Expressions-Analyse von

Promotor-Reporter-Konstrukten in transgenen Tieren (Hallikas et al., 2006; Khokha and Loots, 2005; Poulin et al., 2005; Shin et al., 2005). Aufgrund der sehr gut etablierten und vergleichsweise wenig zeitaufwendigen Methoden zur Herstellung transgener Fliegen, ist *Drosophila* auch unter diesem Gesichtspunkt für die Analyse der Transkriptionsregulation spezifischer Gene besonders gut geeignet.

1.1.3 *Drosophila*-Oogenese

Die paarigen Ovarien von *Drosophila* bestehen jeweils aus 15-16 so genannten Ovariolen (Abb. 1.1.2.) (King, 1970) (Spradling, 1993).

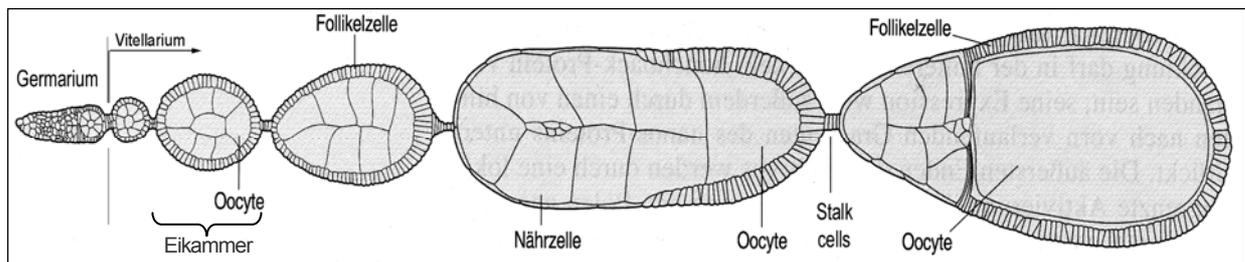


Abbildung 1.1.2.: Schematische Darstellung einer Ovariolen von *Drosophila melanogaster*. Der anteriore, distale Teil der Ovariolen ist links orientiert. (aus: Wolpert, Entwicklungsbiologie, Spektrum Akademischer Verlag, 1999)

Die Oogenese beginnt im so genannten Germarium am anterioren Ende der Ovariolen mit der Bildung eines Cystoblasten durch die asymmetrische Teilung der Keimbahn-Stammzellen. Nach vier weiteren unvollständigen mitotischen Teilungen entsteht daraus eine Cyste, bestehend aus 16 über Cytoplasmabrücken miteinander verbundenen Keimbahn-Zellen, der eigentlichen Oocyte und 15 polyploiden Nährezellen, welche die Oocyte mit RNAs und Proteinen versorgen. Während der weiteren Entwicklung werden die Keimbahn-Zellen von den somatischen Follikelzellen umwandert (Margolis and Spradling, 1995), welche für die Synthetisierung der Eihülle (Vitellinmembran und Chorion) verantwortlich sind und eine Schlüsselfunktion bei der Etablierung der Polarität des Embryos haben (s.u.). Die dadurch gebildete Eikammer durchwandert das Germarium weiter in posteriore Richtung, wobei die eigentliche Oocyte eine asymmetrische Position am posterioren Ende der Cyste einnimmt und dadurch die primären Koordinaten der antero-posterioren Achse festlegt (Huynh and St Johnston, 2004; Spradling, 1993). Einzelne Eikammern werden durch eine Reihe von fünf bis sieben speziellen Follikelzellen, den so genannten „stalk cells“, voneinander getrennt. Die Nährezellen degenerieren gegen Ende der Oogenese (s. Einleitung zu Teil 2). Basierend auf morphologischen Kriterien ist die Oogenese in 14 aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien aufgeteilt worden (Abb. 1.1.3.); dabei beschreibt das Stadium 1 die neu gebildete Eikammer im posterioren Bereich des Germariums und das reife Ei charakterisiert das Stadium 14 (Lin and Spradling, 1993).

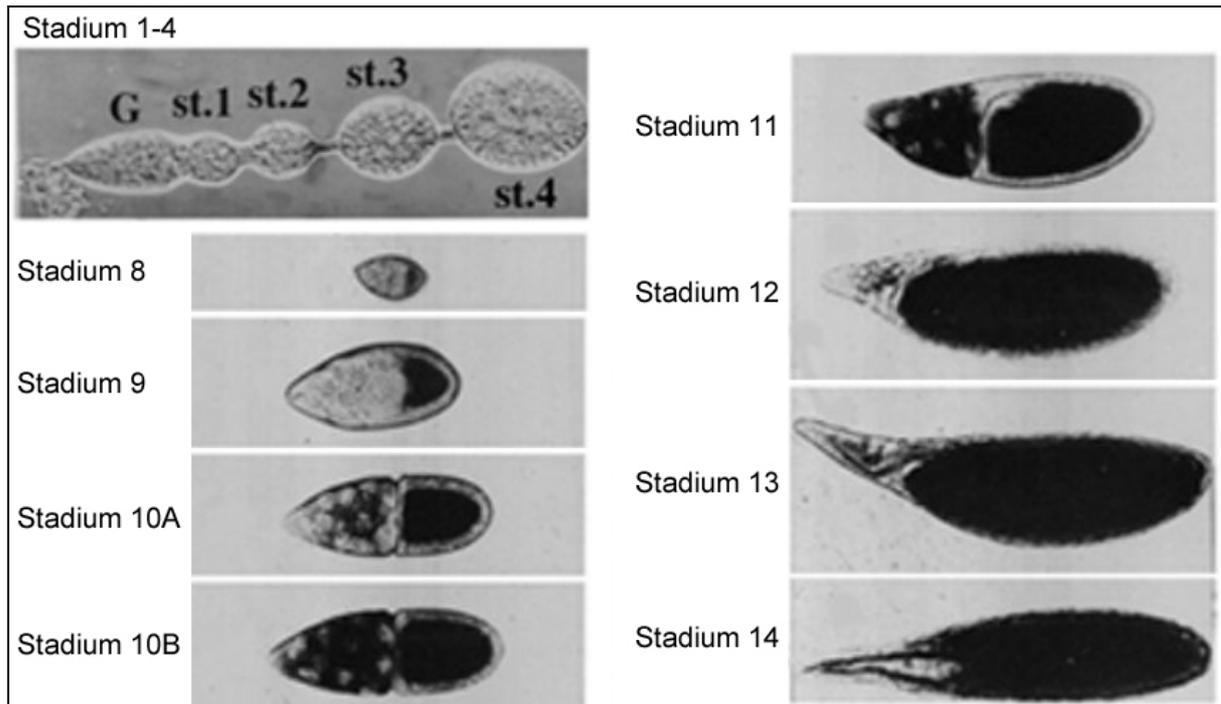


Abbildung 1.1.3.: Ausgewählte Oogenese-Stadien von *Drosophila melanogaster*. Oben links ist der distale Teil einer Ovariolen gezeigt, mit dem Germarium an der anterioren Spitze (G) und jungen Eikammern der Stadien 1-4. Die Eikammern der Stadien 8-14 sind jeweils aus der Ovariolen frei präpariert. Anterior ist jeweils nach links orientiert. (King, 1970)

1.1.4 Festlegung der Körperachsen während der Oogenese

Während der frühen Oogenese befinden sich sowohl der Oocytenkern, als auch die eng damit assoziierte *grk*-mRNA am posterioren Ende der Eikammer. *grk* codiert für ein TGF- α (Transforming Growth Factor α) homologes Protein (Neuman-Silberberg and Schubach, 1993), welches als Ligand an das im Follikelepithel exprimierte *Drosophila*-Homolog des EGF-Rezeptors (Epidermal Growth Factor-Rezeptor; EGFR, (Livneh et al., 1985; Price et al., 1989; Schejter et al., 1986; Shilo et al., 1986; Wadsworth et al., 1985) bindet. Über den durch das Grk-Signal induzierten EGFR-Signaltransduktionsweg (s.u.) werden die dem Oocytenkern direkt benachbarten Follikelzellen als posterior determiniert. Diese posterioren Follikelzellen senden daraufhin ein noch unbekanntes Signal an die Oocyte zurück, welches ab Stadium 6 dazu führt, dass das Mikrotubuli-Cytoskelett der Oocyte so umorganisiert wird, dass sich die Minus-Enden der Mikrotubuli am anterioren Kortex befinden, während die Plus-Enden am posterioren Pol liegen (Theurkauf et al., 1993; Theurkauf et al., 1992). Diese Umorganisation des Mikrotubuli-Netzwerks induziert zum einen durch die Lokalisation von Determinanten (z.B. *bicoid*-mRNA anterior, *nanos*-mRNA posterior) die Festlegung der anteriorposterioren Achse, und zum anderen die in Stadium 7 einsetzende Wanderung des Oocytenkerns zu einer Position am anterioren Kortex der Oocyte. Die damit verbundene Umlagerung der *grk*-mRNA determiniert dann, wiederum über den Grk/EGFR-Signalweg, die direkt benachbarten Zellen, sich als dorsal zu entwickeln und legt damit den Grundstein für die dorsoventrale Achse des Embryos (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995).

1.1.5 Der EGFR-Signalweg

Der EGF-Rezeptor, der in der Oogenese, wie oben beschrieben, eine zentrale Rolle bei der Initiation beider Hauptkörperachsen spielt, gehört zur großen Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) (Freeman, 1998; Schlessinger, 2000). Alle Mitglieder dieser Protein-Familie liegen als Signal-Rezeptoren in der Plasmamembran vor und katalysieren, als Folge der Aktivierung durch die Bindung eines Liganden, den Transfer eines γ -Phosphates von ATP auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosins des Zielproteins (Hunter, 1998). RTKs spielen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle nahezu aller fundamentalen Prozesse in der Zelle, wie zum Beispiel Zellzyklus, Zellwanderung, allgemeiner Zellstoffwechsel und diverse Zell-Differenzierungs-Prozesse (Moghal and Sternberg, 1999). RTKs liegen in der Zellmembran in den meisten Fällen zunächst als inaktive Monomere vor. Die Bindung eines Liganden bewirkt als Folge einer Konformationsänderung die Rezeptor-Dimerisierung, welche wiederum zur gegenseitigen Phosphorylierung beider Rezeptormonomere (Autophosphorylierung) an spezifischen cytoplasmatischen Domänen führt (Jiang et al., 1999; Lemmon and Schlessinger, 1994; Schlessinger et al., 1988; Yarden and Ullrich, 1988). Die Bindung eines Liganden an eine RTK ist relativ spezifisch, der daraufhin intrazellulär in Gang gesetzte Signaltransduktionsweg in Form einer Kinase-Kaskade ist dagegen bei den meisten RTKs identisch (Bar-Sagi and Hall, 2000; Schlessinger, 1994). An spezifische Phosphotyrosine der aktivierten RTK bindet zunächst das Adapterprotein DRK (Downstream of Receptor Kinase, auch Grb in Vertebraten) (Lowenstein et al., 1992; Olivier et al., 1993; Pawson et al., 1993; Simon et al., 1993). DRK rekrutiert den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos (Son-of-Sevenless), wodurch dieser wiederum, durch die Katalyse des Austausches von GDP gegen GTP, die Aktivierung des G-Proteins Ras bewirkt. Aktiviertes Ras bindet daraufhin das Effektor-Protein Raf, wodurch dieses zur Plasmamembran rekrutiert und aktiviert wird (Avruch et al., 2001; Kolch, 2000). Als Folge davon phosphoryliert Raf MAPKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase, auch MEK). MAPKK wiederum aktiviert mittels Phosphorylierung MAPK (auch ERK), welche als Folge davon in den Zellkern gelangt und dort durch Phosphorylierung die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert (Kolch, 2000; Marshall, 1994). Nur in wenigen Ausnahmefällen wirkt der EGFR-Signalweg nicht durch die Regulierung von Transkriptionsfaktoren (Bergmann et al., 1998; Bergmann et al., 2002; Duchek and Rorth, 2001).

Der EGFR-Signalweg spielt in *Drosophila*, neben der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Funktion bei der Spezifizierung des Follikelzellschicksals in der Oogenese, eine wichtige Rolle während einer Vielzahl weiterer Entwicklungsprozesse, zum Beispiel in der Embryogenese oder der Imaginalscheiben-Entwicklung (Schweitzer and Shilo, 1997). In *Drosophila* sind vier EGFR-Liganden identifiziert worden: Spitz (Spi), Keren (Krn), Grk und Vein (Vn) (Shilo, 2003), von denen die ersten drei zur EGF/TGF- α Familie gehören und als inaktive Transmembran-Proteine exprimiert werden, die durch Proteolyse aktiviert werden (Freeman, 1994; Ghiglione et al., 2002; Lee et al., 2001; Schweitzer et al., 1995; Urban et al., 2002). Grk hat ausschließlich die, im vorigen Abschnitt beschriebene, Funktion bei der Initiation der Körperachsen während der Oogenese, (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993; Roth et al., 1995). Spi hat dagegen unterschiedliche

Funktionen (Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993; Rutledge et al., 1992). Krn ist strukturell verwandt mit Spi und hat in den meisten Fällen eine redundante Funktion (Brown et al., 2007; McDonald et al., 2006; Reich and Shilo, 2002; Urban et al., 2002). Vn ist ein sezerniertes Protein, das strukturelle Ähnlichkeiten zu den Neuregulinen (NRG) der Vertebraten aufweist und für eine niedrige Aktivierung des EGFR-Signalwegs gebraucht wird (Golembo et al., 1999; Schnepf et al., 1996).

1.1.6 Die dorsoventrale Musterbildung des Embryos

Das dorsale Grk-Signal initiiert nicht nur die Musterbildung in der Eihülle, sondern auch die dorsoventrale Musterbildung des Embryos (Roth, 2003). Die Aktivierung des EGFR in den dorsalen Follikelzellen der Eikammer führt zur Transkriptions-Repression des Gens *pipe*, wodurch dieses nur in 40% des Ei-Umfangs in der ventralen Region des Follikelepithels exprimiert wird (Sen et al., 1998). Ventral lokalisiertes Pipe initiiert eine extrazelluläre proteolytische Kaskade (Nilson and Schupbach, 1998; Schupbach and Wieschaus, 1991; Stein et al., 1991; Stein and Stevens, 1991), zu der die Produkte der Gene *nudel* (*ndl*) (LeMosy et al., 1998), *easter* (*ea*) (Chasan and Anderson, 1989), *snake* (*snk*) (DeLotto and Spierer, 1986) und *gastrulation defective* (*gd*) (Konrad et al., 1998) gehören. Diese proteolytische Kaskade bewirkt die Aktivierung des Liganden Spätzle (DeLotto and DeLotto, 1998; Morisato and Anderson, 1994), dessen aktivierte Form an den Toll-Rezeptor in der Plasmamembran des Embryos bindet (Hashimoto et al., 1991). Das ventrale Toll-Signal führt zur Kern-Translokation des Dorsal-Proteins, eines Homologs der NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren, in Form eines von ventral nach dorsal abnehmenden Gradienten, der die Expression zygotischer Musterbildungs-Gene entlang der dorsoventralen Achse determiniert (Moussian and Roth, 2005; Roth et al., 1989; Rusch and Levine, 1994; Rusch and Levine, 1996). Bei der Kontrolle der extrazellulären Protease-Kaskade spielt der Serin-Protease-Inhibitor Serpin 27A eine entscheidende Rolle, wahrscheinlich indem die Aktivität der Protease Easter reguliert wird (Ligoxygakis et al., 2003; Misra et al., 1998).

1.1.7 Das *pipe*-Gen

Der *pipe*-Locus codiert bis zu 11 verschiedene Protein-Isoformen (s. Abb. 1.2.18), von denen zwei in ventralen Follikelzellen exprimiert werden, Pip-PA, auch Pipe-ST2 genannt, und Pip-PH (Sen et al., 1998; Sergeev et al., 2001). Davon spielt Pipe-ST2 nachweislich eine Rolle bei der Polarisierung der embryonalen DV-Achse (Sen et al., 1998). Aufgrund der vergleichbaren Expression wird vermutet, dass Pip-PH in der Oogenese eine redundante Funktion zu Pip-ST2 hat (Sergeev et al., 2001). Mutationen, die die Polarität des Follikelepithels beeinflussen, verändern das räumliche Muster der *pipe*-Expression, und der Verlust der *pipe* Funktion im Follikelepithel führt zur Dorsalisierung des Embryos. Außerdem ist gezeigt worden, dass die ektopische Expression der Isoform Pipe-ST2 in *pipe*-mutanten Weibchen die Bildung lateraler und ventraler, embryonaler Musterelemente rettet und die dorsoventrale Achse des Embryos umorientieren kann (Nilson and Schupbach, 1998; Sen et al., 1998). Neben dieser entscheidenden Rolle bei der dorsoventralen Achsenbildung hat Pipe auch eine Funktion in den embryonalen Speicheldrüsen (Zhu et al., 2005).

Die unterschiedlichen Pipe-Isoformen enthalten jeweils eine von 11 Kopien einer variablen Domäne, die homolog zu verschiedenen Vertebraten Glycosaminoglycan-Sulfotransferasen sind (Kobayashi et al., 1997; Kobayashi et al., 1999). Wie diese Enzyme, ist auch Pipe im Golgi-Apparat lokalisiert, wobei für die korrekte Lokalisation von Pipe die Funktion der Proteindisulfidisomerase Windbeutel benötigt wird (Konsolaki and Schupbach, 1998; Ma et al., 2003; Sen et al., 2000). Es gibt experimentelle Hinweise, dass auch *pipe* als Sulfotransferase fungiert (Luders et al., 2003; Sen et al., 2000; Zhu et al., 2005). Allerdings ist gezeigt worden, dass es sich bei den Substraten von *pipe* nicht um Glycosaminoglycane handelt, sondern möglicherweise um eine andere Art von Glycoproteinen oder um Glycolipid-assoziierte Kohlenhydrate (Zhu et al., 2005; Zhu et al., 2007), welche in den Follikelzellen wahrscheinlich eine nicht diffusionsfähige Komponente der Extrazellulärmatrix (ECM) darstellen. Diese ECM Komponente wird vermutlich vor der Synthese der Vitellinmembran und des Chorions von den ventralen Follikelzellen zwischen Oocyte und Follikelepithel lokal abgelegt und verankert. Nach der Eiablage führt die ventrale Lokalisation dieser Komponente dann zu der Initiation der oben genannten proteolytischen Kaskade und damit zur Initiation der embryonalen DV Achse (Roth, 2003). Da *pipe* das einzige bisher identifizierte, asymmetrisch exprimierte Gen im Follikelepithel ist, welches eine Rolle bei der Induktion der embryonalen DV Achse spielt, stellt es wahrscheinlich die Kernkomponente dar, die für die Übertragung der dorsoventralen Polarität, von der Eikammer auf den Embryo, verantwortlich ist.

1.1.8 Die Regulation der *pipe*-Expression in Ovarien

Wie oben beschrieben wird die Expression von *pipe* durch den Grk/EGFR-Signalweg dorsal reprimiert. In Grk-Antikörperfärbungen an Eikammern im frühen Stadium 10 ist die Aufnahme von Grk Protein in dorsale Follikelzellen in Form von Vesikeln zu erkennen (Peri et al., 1999). Die dadurch gekennzeichnete Region starker EGFR-Signal-Aktivität ist jedoch weit entfernt von der Grenze der ventralen *pipe*-Expression.

Es ist daher vorgeschlagen worden, dass der Einfluss des EGFR-Signals auf die *pipe*-Transkription indirekt erfolgt. Insbesondere wurde dabei eine Involvierung der Gene *mirror* und *fringe* vermutet (Jordan et al., 2000; Zhao et al., 2000). Inzwischen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass diese beiden Gene keine Rolle bei der Regulation von *pipe* spielen (Peri et al., 2002). In jüngerer Zeit hat es im Gegenteil überzeugende Hinweise für einen direkten Einfluss von Grk auf die *pipe*-Expression gegeben, die darauf hindeuten, dass Grk als weitreichendes Signalmolekül in Form eines Gradienten wirken kann. Es ist gezeigt worden, dass der EGFR auch in ventralen Follikelzellen aktiviert wird (Pai et al., 2000). D-cbl ist ein negativer Regulator des EGFR-Signalwegs, der die Aktivität des EGFR-Weges dadurch senkt, dass er den aktivierten EGFR-Komplex in den Ubiquitin-abhängigen Abbauweg schleust (Joazeiro et al., 1999; Lee et al., 1999; Levkowitz et al., 1999; Miyake et al., 1998; Yokouchi et al., 1999). In ventralen, *D-cbl*-mutanten Follikelzell-Klonen, kommt es zur ektopischen Aktivierung des EGFR-Signalwegs und als Folge davon zur zellautonomen Repression von *pipe* (Pai et al., 2000). Da die ventrale Aktivierung des EGFR in *D-cbl*-mutanten Zellklonen von Gurken abhängt (Pai et al., 2000), deuten diese Experimente

darauf hin, dass Gurken einen direkten Einfluss auf die ventralen Follikelzellen hat. Obwohl sich Grk in Antikörperfärbungen nur ganz dorsal nachweisen lässt, bildet es somit höchstwahrscheinlich tatsächlich einen bis nach ventral reichenden Gradienten. Interessanterweise bestätigt auch ein rein mathematisches Modell, dass die beobachtete Geometrie des *pipe*-Expressionsmusters direkt durch einen Grk-Morphogengradienten reguliert werden kann (Goentoro et al., 2006). Auch die Veränderung des *pipe*-Expressionsmusters durch die simulierte Hyper- oder Hypoaktivierung des EGFR-Signalwegs im Rahmen dieses statistischen Modells, spiegelt die experimentell beobachtete, dorsale Ausweitung oder Reduktion der *pipe*-Expression wider (Goentoro et al., 2006).

Weitere experimentelle Hinweise für einen direkten Einfluss des EGFR-Signalwegs auf die *pipe*-Expression stammen von Mosaik-Untersuchungen, in denen mit Hilfe mutanter Zellklone die Rolle von Komponenten des EGFR-Signalwegs untersucht wurde (James et al., 2002; Peri et al., 2002). Für die Gene *Ras* oder *Raf* homozygot mutante Zellklone im Follikelepithel zeigen jeweils, dass der EGFR-Signalweg in allen dorsalen Follikelzellen entlang der gesamten anteriorposterioren Achse der Eikammer zellautonom für die Repression von *pipe* benötigt wird. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, wirken Ras und Raf als Komponenten der kanonischen MAPK-Kaskade downstream von unterschiedlichen Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) (Wassarman et al., 1995). Da jedoch eine frühe Rolle von Torso und Sevenless bei der Spezifizierung der DV-Achse ausgeschlossen werden kann (Schweitzer and Shilo, 1997), und da die Analyse von Zellklonen, die für eine spezifische Komponente des FGF-Rezeptor-Signalwegs mutant sind, demonstriert, dass FGF keinen Einfluss auf die *pipe*-Expression hat (Peri et al., 2002), ist der beobachtete Effekt der *Ras/Raf*-Klone höchstwahrscheinlich spezifisch für den EGFR-Signalweg.

Die oben erwähnten Resultate machen deutlich, dass Grk tatsächlich als weitreichendes Signalmolekül wirken und die Expression von *pipe* direkt regulieren kann. Das schließt jedoch die Beteiligung sekundärer Verfeinerungs-Prozesse oder paralleler Signal-Kaskaden, zusätzlich zu einem Gradienten-Mechanismus, bei der Festlegung der *pipe*-Domäne nicht aus. In der Tat werden viele bedeutende Musterbildungs-Prozesse in redundanter Weise reguliert (Tautz, 1992). Außerdem spielen sekundäre Verfeinerungs-Prozesse häufig eine wichtige Rolle im Anschluss an Gradienten-gesteuerte Mechanismen (Gurdon and Bourillot, 2001). Es ist daher beispielsweise möglich, dass der Grk-Gradient die Expressions-Domäne von *pipe* nur grob definiert, während nachfolgende Signale zur Ausbildung der beobachteten scharfen Grenze der *pipe*-Expression führen.

Die Ausbildung einer gleichmäßigen anterior-posterioren Verteilung von *pipe*, in Form eines geraden, ventralen Streifens konstanter Breite, ist umso erstaunlicher, wenn man berücksichtigt, dass das Grk Protein in Form einer punktförmigen Quelle in direkter Nähe des anterior-dorsal lokalisierten Oocytenkerns vorliegt (Neuman-Silberberg and Schubach, 1993). Die posteriore Wanderung der Follikelzellen könnte bei der Umwandlung der punktförmigen Grk-Quelle in das streifenförmige Muster der *pipe*-Repression eine wichtige Rolle spielen, weil dabei die dorsalen Follikelzellen in direkter Nähe des Oocytenkerns vorbei wandern (Sapir et al., 1998). Wenn Grk die Grenze der *pipe*-Domäne direkt bestimmt, muss das Grk Signal sehr genau mit den morphogenetischen Bewegungen des Follikelepithels während der Oogenese-Stadien 9 und 10 koordiniert werden. Auch morphogenetische Prozesse während späterer Oogenesestadien, die eine weitere Elongation der Eikammer

und damit die Ausformung des reifen Eis bewirken, könnten an der Ausbildung des anterioposterioren *pipe*-Streifens beteiligt sein.

1.1.9 Ziele der Arbeit (1)

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die für die EGFR-vermittelte Repression von *pipe* auf der dorsalen Seite der Eikammer verantwortlich sind. Dazu wurden Kandidaten der *pipe*-Regulation mittels klonaler Analyse direkt getestet. Außerdem wurde die *cis*-regulatorische Region von *pipe* mittels molekularer und bioinformatischer Methoden untersucht. Mit Hilfe dieser Experimente sollten essentielle *cis*-regulatorische Elemente identifiziert werden, durch die sich später die Transkriptionsfaktoren mittels biochemischer Methoden identifizieren lassen.

1.2 Ergebnisse

1.2.1 Klonale Analyse von Kandidaten-Transkriptionsregulatoren

Follikelzellklone, die für Komponenten des EGFR-Signalweges mutant sind und in denen somit das EGFR-Signal nicht weitergeleitet werden kann, haben gezeigt, dass die Repression von *pipe* auf der dorsalen Seite der Eikammer eine direkte Folge der dortigen EGFR-Aktivierung ist (James et al., 2002; Peri et al., 2002). Dieser reprimierende Einfluss des EGFR-Signalweges auf die Expression von *pipe* ist zellautonom, der diese Repression auf der Ebene des *pipe*-Promotors vermittelnde Transkriptionsfaktor ist bisher jedoch nicht identifiziert worden. Daher haben wir den Einfluss potentieller Regulatoren auf die *pipe*-Expression mittels klonaler Analyse untersucht. Dazu wurden jeweils mit Hilfe der FLP/FRT-Technik mutante Follikelzellklone erzeugt (Xu and Rubin, 1993), die durch die Abwesenheit von GFP markiert waren. Die *pipe*-Expression wurde durch die Verwendung von Reporterkonstrukten verfolgt. Für Mutationen auf Chromosom III wurde das bei (Sen et al., 1998) beschriebene *8kb-pipe-LacZ*-Reporterkonstrukt verwendet, für Mutationen auf Chromosom II das weiter unten beschriebene *3kb-us-pipe-LacZ*-Konstrukt.

1.2.1.1 Die ETS-Transkriptionsfaktoren Pointed und Yan spielen keine Rolle bei der Regulation der *pipe*-Expression

Die am besten untersuchten EGFR-regulierten Transkriptionsfaktoren in *Drosophila* sind die ETS-Domänen-Transkriptionsfaktoren Yan (auch Anterior open, Aop genannt) und Pointed (Pnt) (Tootle and Rebay, 2005). Diese beiden antagonistisch wirkenden Proteine spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Auges und des ventralen Ektoderms (Gabay et al., 1996; Rohrbaugh et al., 2002; Treisman, 1996). Pnt und Yan binden an homologe DNA-Bindemotive und konkurrieren so um den Zugang zu den *cis*-regulatorischen Regionen gemeinsamer Zielgene, wobei Pnt als Transkriptionsaktivator und Yan als Repressor fungiert (Lai and Rubin, 1992; O'Neill et al., 1994). *pnt* codiert für zwei alternative Spleiß-Varianten mit identischer DNA-Bindedomäne: den konstitutiven Aktivator Pnt-P1 und den EGFR-regulierten Aktivator Pnt-P2 (Brunner et al., 1994; Klambt, 1993; O'Neill et al., 1994). In Abwesenheit des EGFR-Signals sind die entsprechenden Zielgene durch Yan reprimiert. Die Aktivierung des EGFR führt mittels direkter Phosphorylierung zur Inaktivierung von Yan und zur Aktivierung von Pnt-P2, wodurch Pnt-P2 als Aktivator der zuvor durch Yan reprimierten Gene wirken kann (Flores et al., 2000; Halfon et al., 2000; Xu et al., 2000). Im Gegensatz zu dieser, in den meisten Fällen beobachteten Funktion von Pnt als Aktivator, haben Untersuchungen an der Augenimaginalscheibe Hinweise auf eine mögliche Funktion von Pnt als negativer Regulator erbracht (Kurada and White, 1998; Rebay, 2002; Rohrbaugh et al., 2002). Für Pnt ist außerdem gezeigt worden, dass es während der Oogenese als Folge der EGFR-Aktivierung durch Gurken in Eikammern der Stadien 9-10 in dorsal-anterioren Follikelzellen exprimiert wird und eine Rolle bei der Spezifizierung der dorsalen Anhänge spielt (Morimoto et al., 1996).

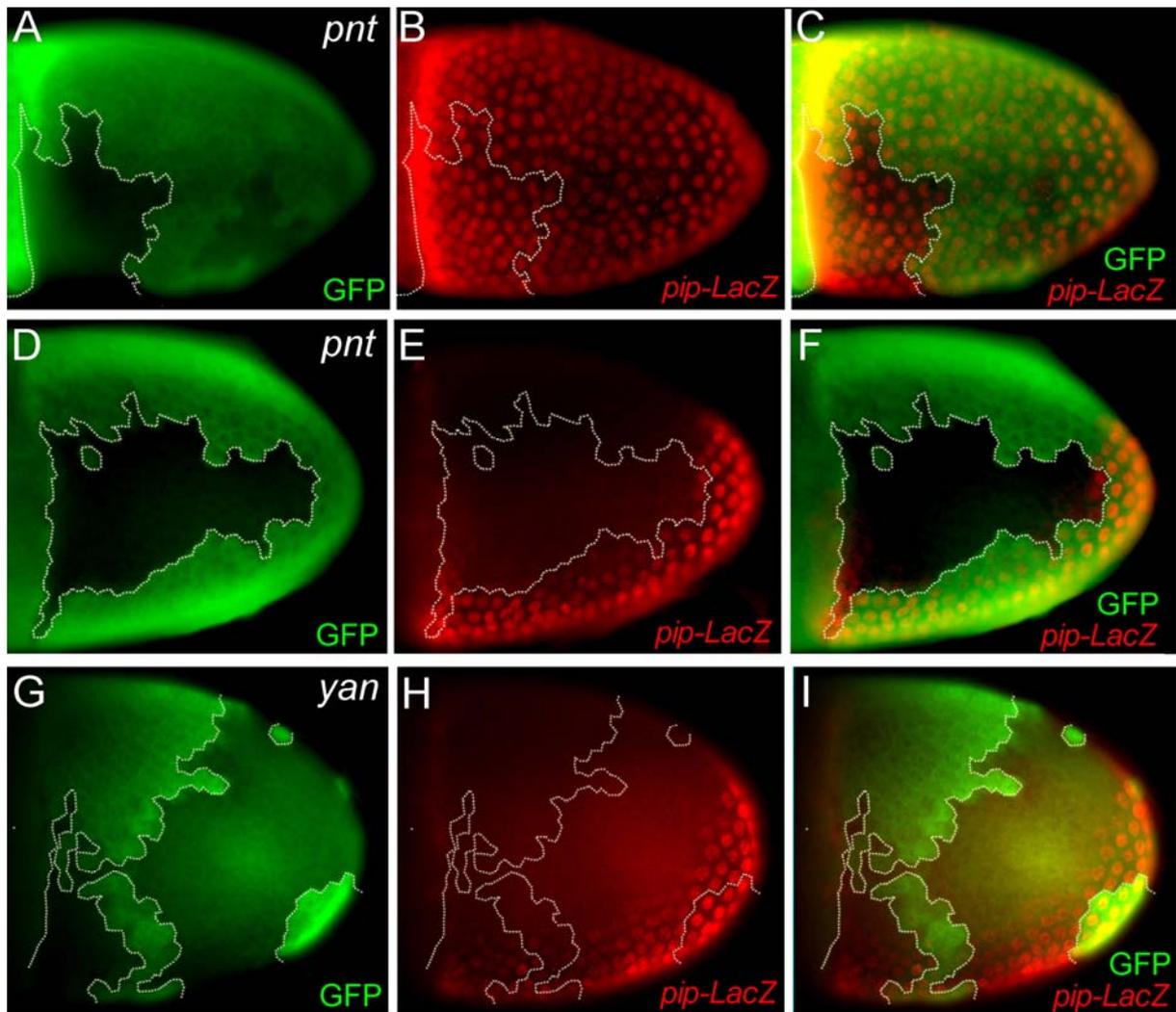


Abbildung 1.2.1.: Die Expression von *pipe* wird durch *pnt*¹⁸⁸- oder *yan*^{XE18}-mutante Follikelzellklone nicht beeinflusst. In dieser und in allen folgenden Abbildungen sind die Eikammern jeweils, sofern nicht anders angegeben, mit dem anterioren Pol nach links und mit der dorsalen Seite nach oben orientiert. (A-I) Stadium 10 Eikammern. Mutante Zellklone sind jeweils durch die Abwesenheit von GFP (grün) markiert. Das mittels anti-βGal-Färbung sichtbar gemachte *pipe-LacZ*-Konstrukt (rot) spiegelt die Expression von *pipe* wieder. (A-C) Ventralansicht. ventral lokalisierter *pnt*¹⁸⁸-Klon, (D-F) Lateralansicht. dorso-lateraler *pnt*¹⁸⁸-Klon, (G-I) von ventral bis dorsal reichender *yan*^{XE18}-Klon.

Um zu untersuchen, ob Pnt oder Yan eine Rolle bei der Expressionsregulation von *pipe* spielen, haben wir GFP-markierte Follikelzellklone für die Nullallele *pnt*¹⁸⁸ (Nullallele für beide Pnt-Isoformen) und *yan*^{XE18} erzeugt. Die Abbildung 1.2.1. zeigt, dass an unterschiedlichen Stellen lokalisierte *pnt*- (A-C und D-F) und *yan*- (G-I) mutante Follikelzellklone jeweils keinen Einfluss auf das Expressionsmuster des *pipe-LacZ*-Reportergens haben. Eine Involvierung der kanonischen EGFR-Effektorgene *pnt* und *yan* bei der Regulation der *pipe*-Expression kann daher ausgeschlossen werden.

1.2.1.2 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Tramtrack hat keinen Einfluss auf die *pipe*-Expression

Tramtrack codiert zwei alternativ gespleißte Zinkfinger-Transkriptions-Repressoren, Ttk69 und Ttk88 (Brown et al., 1991; Harrison and Travers, 1990; Read and Manley, 1992), die unter anderem durch den EGFR-Signalweg reguliert werden (Baonza et al., 2002; Lai et al., 1997; Li et al., 1997; Tang et al., 1997). Beiden Isoformen gemeinsam ist ein BTB/POZ-Motiv, welches Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, sie unterscheiden sich jedoch in der DNA-bindenden Domäne und regulieren daher vermutlich unterschiedliche Zielgene (Fairall et al., 1992; Read and Manley, 1992). Die Funktionen von *ttk69* und *ttk88* sind insbesondere in der Augenentwicklung intensiv untersucht worden (Baonza et al., 2002; Lai and Li, 1999; Li et al., 1997; Tang et al., 1997; Wen et al., 2000b; Xiong and Montell, 1993). Es ist gezeigt worden, dass Ttk69 während aller Oogenesestadien im gesamten Follikel epithel exprimiert wird, während eine Expression von Ttk88 in Ovarien zu keiner Zeit nachweisbar ist (French et al., 2003; Read et al., 1992). In der Oogenese spielt Ttk69 eine Rolle bei der Synthese des Chorion und bei der Morphogenese der dorsalen Anhänge (French et al., 2003).

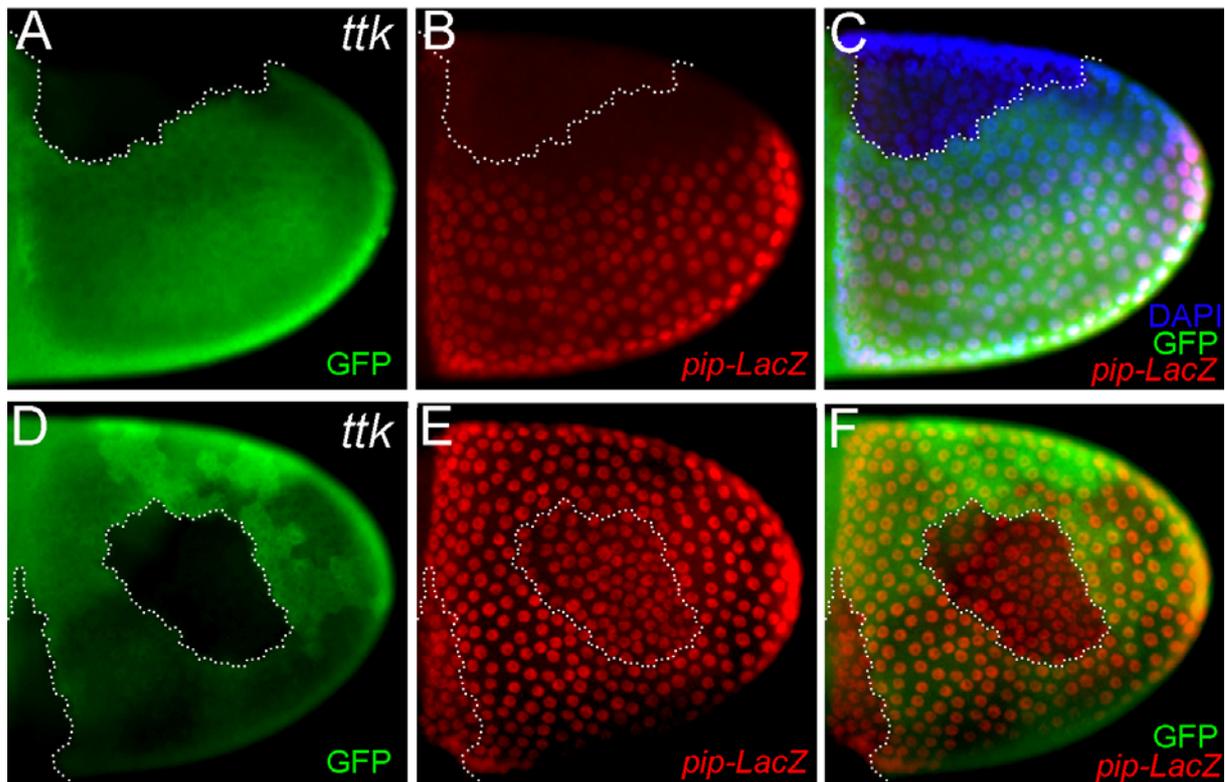


Abbildung 1.2.2.: *ttk*^{1E11}-mutante Follikelzellklone beeinflussen nicht das *pipe*-Expressionsmuster. (A-F) Stadium 10 Eikammern. Mutante Zellklone sind jeweils durch die Abwesenheit von GFP (grün) markiert. Das mittels anti- β Gal-Färbung sichtbar gemachte *pipe-LacZ*-Konstrukt (rot) spiegelt die Expression von *pipe* wieder. In (C) sind zusätzlich die Zellkerne mittels DAPI Färbung markiert (A-C) Lateralansicht, dorsal lokalisierter *ttk*^{1E11}-Klon, (D-F) Ventralansicht, ventral lokalisierte *ttk*^{1E11}-Klone. (C, E) In *ttk*^{1E11}-mutanten Zellklonen sind die Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen dichter gepackt.

Um zu untersuchen, ob Ttk69 in die Regulation der *pipe*-Expression involviert ist, haben wir durch Abwesenheit von GFP markierte Follikelzellklone für das Ttk69 loss-of-function-Allel

ttk^{1E11} erzeugt und die Auswirkungen auf das *pipe-LacZ*-Expressionsmuster verfolgt. Die Abbildung 1.2.2. A-C macht deutlich, dass der Verlust von Ttk69 auf der dorsalen Seite der Eikammer zu keiner ektopischen Expression des Reportergens innerhalb eines entsprechend lokalisierten Klons führt. Auch ventral lokalisierte Klone (Abb. 1.2.1 D-F) führen zu keiner deutlichen Veränderung in der Expressionsstärke. Allerdings zeigen die *ttk*^{1E11}-mutanten Zellen eine zellautonome Veränderung in der „Packungsdichte“. Die mutanten Zellen liegen deutlich enger beieinander, als die benachbarten wildtypischen Zellen. Dies ist anhand der DAPI Färbung in Abbildung 1.2.2.C und besonders deutlich anhand der ventralen *pipe-LacZ* exprimierenden Zellen in Abbildung 1.2.2.E zu erkennen.

1.2.1.3 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor CF2 spielt keine Rolle bei der Regulation der *pipe*-Expression

Ein weiterer Kandidat für die EGFR-vermittelte Transkriptionsregulation von *pipe* ist der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor CF2 (Hsu et al., 1992; Shea et al., 1990). CF2 wird von Oogenesestadium 8 an zunächst in allen die Oocyte umgebenden Follikelzellen exprimiert und vom späten Stadium 9 an als direkte Folge der EGFR-Aktivierung in anterior-dorsalen Follikelzellen post-translational herunter reguliert (Hsu et al., 1996; Hsu et al., 2001; Mantrova and Hsu, 1998). Die ektopische Expression von CF2 mittels eines Hitzeschock-getriebenen Transgens führt zu einer partiellen Ventralisierung der Eikammer und des Embryos. Im Gegensatz dazu führt eine Hitzeschock-induzierte Expression eines antisense Konstrukts zu einer teilweisen Dorsalisierung von Eikammer und Embryo (Hsu et al., 1996). Es ist bisher nicht bekannt, ob CF2 als Transkriptionsrepressor oder als Aktivator fungiert. Sollte CF2 tatsächlich für das räumliche Expressionmuster von *pipe* mit verantwortlich sein, so könnte es in diesem Fall entweder direkt als essentieller Aktivator von *pipe* selbst wirken oder aber indirekt, zum Beispiel durch die Repression eines Repressors.

Um zu untersuchen, ob der Funktionsverlust von CF2 einen Einfluss auf die *pipe*-Expression hat, haben wir den Einfluss von CF2-mutanten Follikelzellklonen auf die Expression des *pipe-LacZ*-Reporters untersucht. Da es keine spezifischen CF2-mutanten Allele gab, haben wir eine Deletion verwendet, in der die gesamte codierende Region, sowie ungefähr 20 kb upstream von CF2 deletiert sind (*Df(2L)γ27*, Hsu et al., 1996). Diese Deletion wurde auf ein *FRT40A*-Chromosom rekombiniert und dann, wie oben für die anderen Kandidaten beschrieben, zur Kloninduktion eingesetzt.

Die Abbildung 1.2.3. zeigt anhand eines großen *Df(2L)γ27*-homozygoten Klons (markiert durch die Abwesenheit von GFP), dass der Verlust von CF2 zu keiner Veränderung des *pipe-LacZ*-Expressionsmusters führt. CF2 kann somit keine entscheidende Rolle bei der Regulation der *pipe*-Expression spielen.

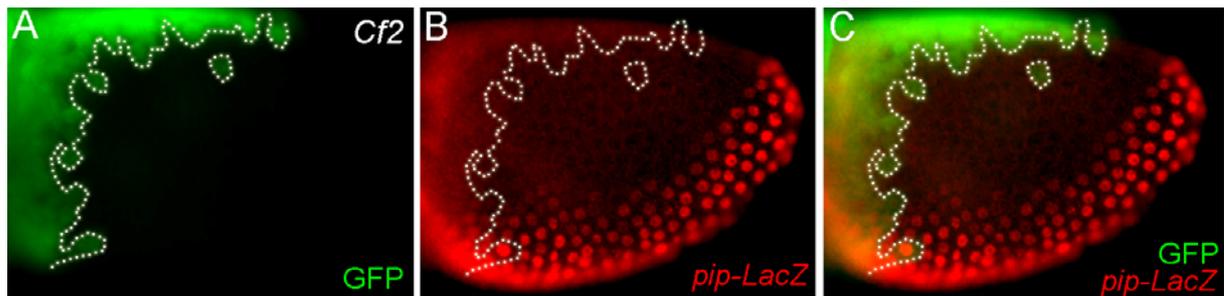


Abbildung 1.2.3.: Der Verlust von CF2 in homozygoten *Df(2L)γ27*-Follikelzellklonen führt zu keiner Veränderung des *pipe*-Expressionsmusters. Stadium 10 Eizelle, Lateralansicht. Die Abwesenheit von GFP (grün) markiert den *Df(2L)γ27*-homozygoten Zellklon. Das mittels anti-βGal-Färbung sichtbar gemachte *pipe-LacZ*-Konstrukt (rot) spiegelt die durch den Klon unveränderte Expression von *pipe* wider.

1.2.1.4 Der HMG-Box-Transkriptionsfaktor Capicua wirkt als essentieller Aktivator der *pipe*-Expression

capicua (*cic*, auch *fettucine* genannt) codiert einen evolutionär hoch konservierten HMG-Box-Transkriptionsfaktor, der während der Embryogenese und der Flügelentwicklung als Repressor fungiert (Jimenez et al., 2000; Roch et al., 2002). Normalerweise wird Cic durch einen RTK-Signalweg herunterreguliert, was im Endeffekt zur Aktivierung der Expression bestimmter Gene führt. Cic wirkt in dieser Weise sowohl downstream des Torso-, als auch des EGFR-Signalweges (Astigarraga et al., 2007; Cinnamon et al., 2004; Goff et al., 2001; Jimenez et al., 2000; Tseng et al., 2007). *cic*-mutante Weibchen legen dorsalisierte Eier in denen sich dorsalisierte Embryos entwickeln (Atkey et al., 2006; Goff et al., 2001). Es ist außerdem gezeigt worden, dass *pipe* in *cic*-mutanten Eizellen nicht exprimiert wird (Goff et al., 2001). Cic selbst wird in Stadium 9-Eizellen uniform im gesamten Follikel epithel exprimiert und später, im frühen Stadium 10, in anterior-dorsalen Follikelzellen herunterreguliert. Diese Herunterregulierung beruht auf der EGFR-abhängigen Relokalisierung des Proteins aus den Kernen ins Cytoplasma (Astigarraga et al., 2007). Hierzu ist jedoch zu beachten, dass die anterior-dorsale Herunterregulierung von Cic später und in einem deutlich kleineren (nur wenige Zellen umfassenden) Bereich der Eizelle erfolgt, als die Repression von *pipe*. *pipe* wird zu keiner Zeit auf der dorsalen Seite exprimiert, sondern ist bereits während der beginnenden Expression im frühen Stadium 9 nur ventral nachzuweisen. Die Abbildung 1.2.4. K-N zeigt eine Eizelle im frühen Stadium 10, die parallel mit Antikörpern gegen Cic und gegen das, mit Hilfe des *pipe-LacZ*-Konstrukts exprimierte, β-Galactosidase Reporterprotein gefärbt worden ist. Man erkennt sehr deutlich, dass sogar in diesem späten Stadium der *pipe*-Expression, Cic noch nahezu uniform im gesamten Follikel epithel verteilt ist und tatsächlich nur ganz dorsal in wenigen Zellen herunterreguliert ist (siehe Pfeil in Abb. 1.2.4. K). In den von uns durchgeführten anti-Cic Antikörper-Färbungen konnten wir zu keinem Zeitpunkt eine größere Ausdehnung als die in der Abbildung gezeigte beobachten. In späteren Stadien (ab Stadium 11) liegt Cic im Gegenteil wieder uniform im gesamten Follikel epithel vor. Cic ist daher nicht in die dorsale Repression von *pipe* involviert. Im weiteren Verlauf von Stadium 10 lässt die Expression von *pipe* nach und die mRNA ist bereits am Ende von Stadium 10 nicht mehr nachweisbar. (Peri et al., 2002). Da Cic auch zu diesem späteren Zeitpunkt bis auf die in Abbildung 1.2.4. K

erkennbare dorsale Region uniform verteilt ist, spielt es auch bei diesem späteren Rückgang der *pipe*-Expression keine Rolle.

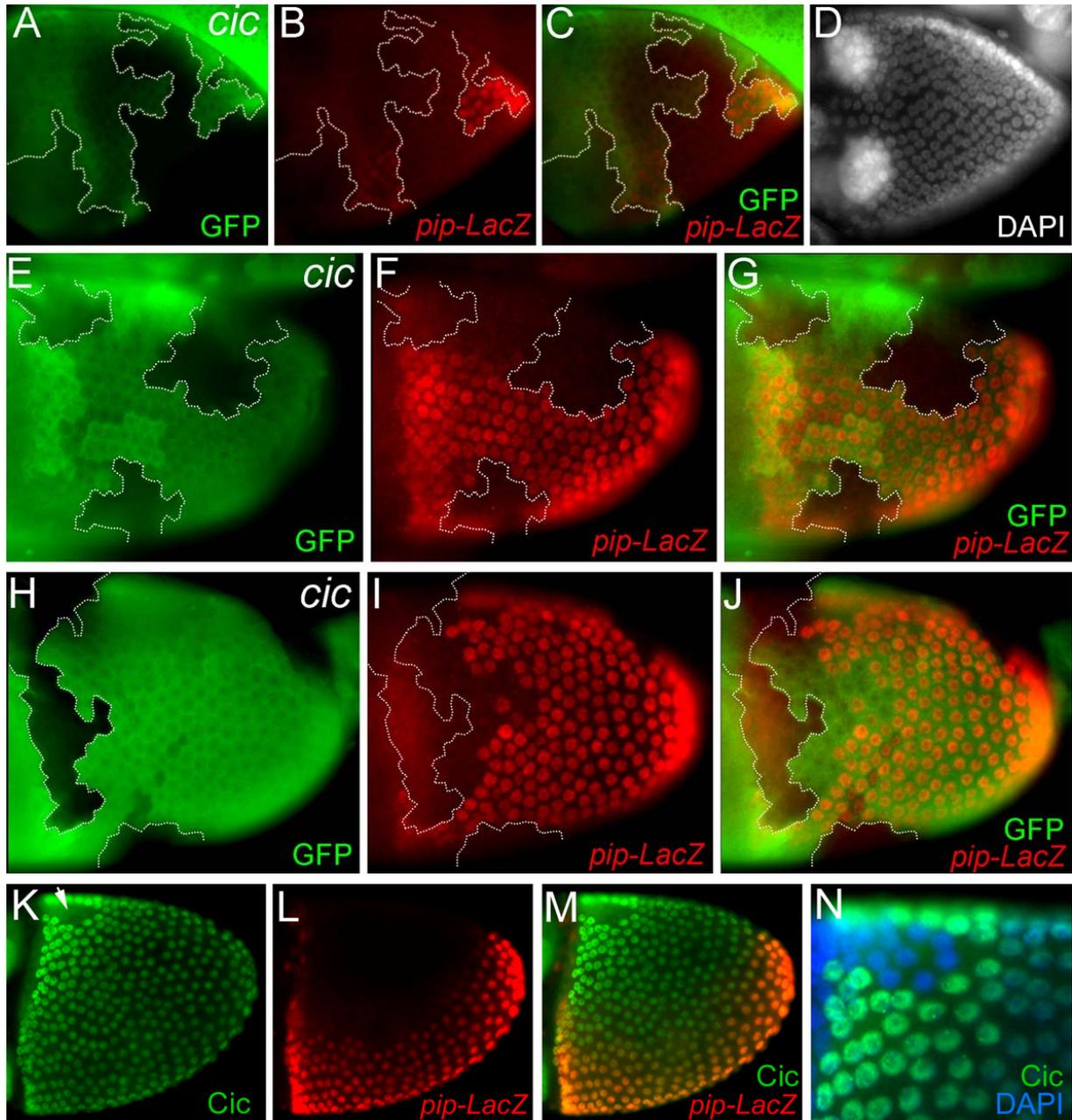


Abbildung 1.2.4.: In cic^{fetU6} -mutanten Follikelzellklonen wird *pipe* nicht exprimiert. (A-J) Eikammern mit cic^{fetU6} -mutanten Zellklonen, die jeweils durch die Abwesenheit von GFP (grün) markiert sind. Das mittels anti- β Gal-Färbung sichtbar gemachte *pipe-LacZ*-Konstrukt (rot) spiegelt die Expression von *pipe* wieder. (A-D) Eikammer, frühes Stadium 9, lateral-Ansicht. Die DAPI Färbung in (D) zeigt, dass die Wanderung der Hauptkörperfollikelzellen noch nicht abgeschlossen ist. (E-G) Stadium 10 Eikammer, ventral-lateral orientiert. (A-G) In den allermeisten Fällen (>97%) wird *pipe-LacZ* zellautonom in cic^{fetU6} -mutanten Zellen nicht exprimiert. (H-J) In seltenen Fällen wurde nicht zellautonomes Ausbleiben der *pipe-LacZ*-Expression bis zu 4 Zelldurchmesser außerhalb des Zellklones beobachtet. (K-N) Stadium 10 Eikammer. Anti-Cic Antikörperfärbung in grün, anti- β Gal-Färbung (*pipe-LacZ*) in rot, DAPI in blau. Der direkte Vergleich der beiden Expressionsmuster demonstriert, dass *cic*, während die dorsale Reprimierung von *pipe* stattfindet, nahezu uniform im gesamten Follikelepithel verteilt ist und nur in wenigen Zellen ganz dorsal (siehe Pfeil) herunterreguliert ist. Die Abbildung zeigt die maximale, von uns beobachtete Ausdehnung der Cic-Herunterregulierung. (N) Der vergrößerte Ausschnitt der dorsalen anterioren Region verdeutlicht anhand der DAPI-gefärbten Zellkerne, dass die dorsalen Cic-freien Zellen intakt sind.

Wir wollten insbesondere prüfen, ob die Aktivierung der *pipe*-Expression durch Cic während aller Expressionsstadien zellautonom erfolgt. Es ist gezeigt worden, dass Cic bei der Musterbildung des Chorions in der Tat zellautonom in ventralen und lateralen Follikelzellen benötigt wird, um die Bildung dorsaler Anhänge zu reprimieren (Atkey et al., 2006). Allerdings hängt die Funktion von Cic bei der Musterbildung des Chorions von der ektopischen Expression von *mirror* ab, welches bei der Regulation der *pipe*-Expression nachweislich keine Rolle spielt (Peri et al., 2002).

Um die Rolle von Cic bei der Regulation der *pipe*-Expression genauer zu untersuchen, haben wir Follikelzellklone erzeugt, die homozygot für das Nullallel *cic^{fetU6}* sind. Die Expression von *pipe* wurde dabei wieder über ein *pipe-LacZ*-Reportergen verfolgt.

In den meisten Fällen war in der Tat eine direkte Korrelation zwischen dem Ausbleiben der *pipe*-Expression und dem mutanten Zellklon zu erkennen (Abb. 1.2.4. A-G). Dieser Effekt wurde bereits mit Auftreten der ersten *pipe*-Expression während des frühen Stadiums 9 beobachtet (Abb. 1.4.2. A-D). Überraschenderweise haben wir in seltenen Fällen (<3%) nicht-zellautonome Effekte beobachtet (Abb. 1.4.2. H-J). Die Klongenze war im Maximalfall bis zu 4 Zelldurchmesser von der *pipe-LacZ*-Expressionsdomäne entfernt. Interessanterweise wurden ähnliche Effekte auch für die Expression von BR-C in *cic^{fetU6}*-mutanten Follikelzellklonen beobachtet (Atkey et al., 2006). Der deutliche Effekt, den der Funktionsverlust von *cic* auf die Expression von *pipe* hat, zeigt, dass Cic von Beginn der *pipe*-Expression an im gesamten Follikelepithel als essentieller Aktivator benötigt wird.

1.2.1.5 Der Verlust der globalen Corepressoren Groucho oder CtBP führt zu keiner Veränderung des *pipe*-Expressionsmusters

Die weiter unten gezeigten Resultate der molekularen *pipe*-Promotor-Analyse deuten darauf hin, dass es innerhalb des *cis*-regulatorischen Moduls von *pipe*, welches die Expression in der Eikammer reguliert, eine Repressor-Bindestelle gibt. Die meisten Transkriptions-Repressoren benötigen einen (oder mehrere) Corepressoren, um die Transkription eines Zielgenes zu unterdrücken. Ein Hauptunterscheidungskriterium für Repressoren ist die Distanz, über die sie ihre Funktion vermitteln. Während short-range-Repressoren über eine Distanz von weniger als 100 bp die Genexpression inhibieren, agieren long-range-Repressoren über Distanzen von über 1 kb (Courey and Jia, 2001; Gray and Levine, 1996b). Die unterschiedlichen Klassen von Repressoren interagieren jeweils auch mit spezifischen long-range- und short-range-Corepressoren.

Ein besonders intensiv untersuchter und evolutionär hoch konservierter long-range-Corepressor, der mit einer Vielzahl unterschiedlicher Repressoren interagiert, ist Groucho (Gro) (Buscarlet and Stifani, 2007; Chen and Courey, 2000; Fisher and Caudy, 1998; Mannervik et al., 1999; Parkhurst, 1998). Eine Reihe der beschriebenen Gro-abhängigen Repressoren, sowie Gro selbst, werden durch den EGFR-Signalweg reguliert (Hasson et al., 2005; Hasson and Paroush, 2006; Price et al., 1997). Um zu analysieren, ob Gro als Corepressor für die Regulation der *pipe*-Expression benötigt wird, haben wir *gro^{E48}*-(loss-of-function-Allel) mutante Follikelzellklone erzeugt und den Einfluss auf die Expression des

pipe-LacZ-Reportergens untersucht. Die Abbildung 1.2.5. A-C macht deutlich, dass der Verlust der *groucho* Funktion keine Veränderung des Expressionsmusters bewirkt. Groucho alleine kann somit keine essentielle Funktion bei der Regulation der *pipe*-Expression haben.

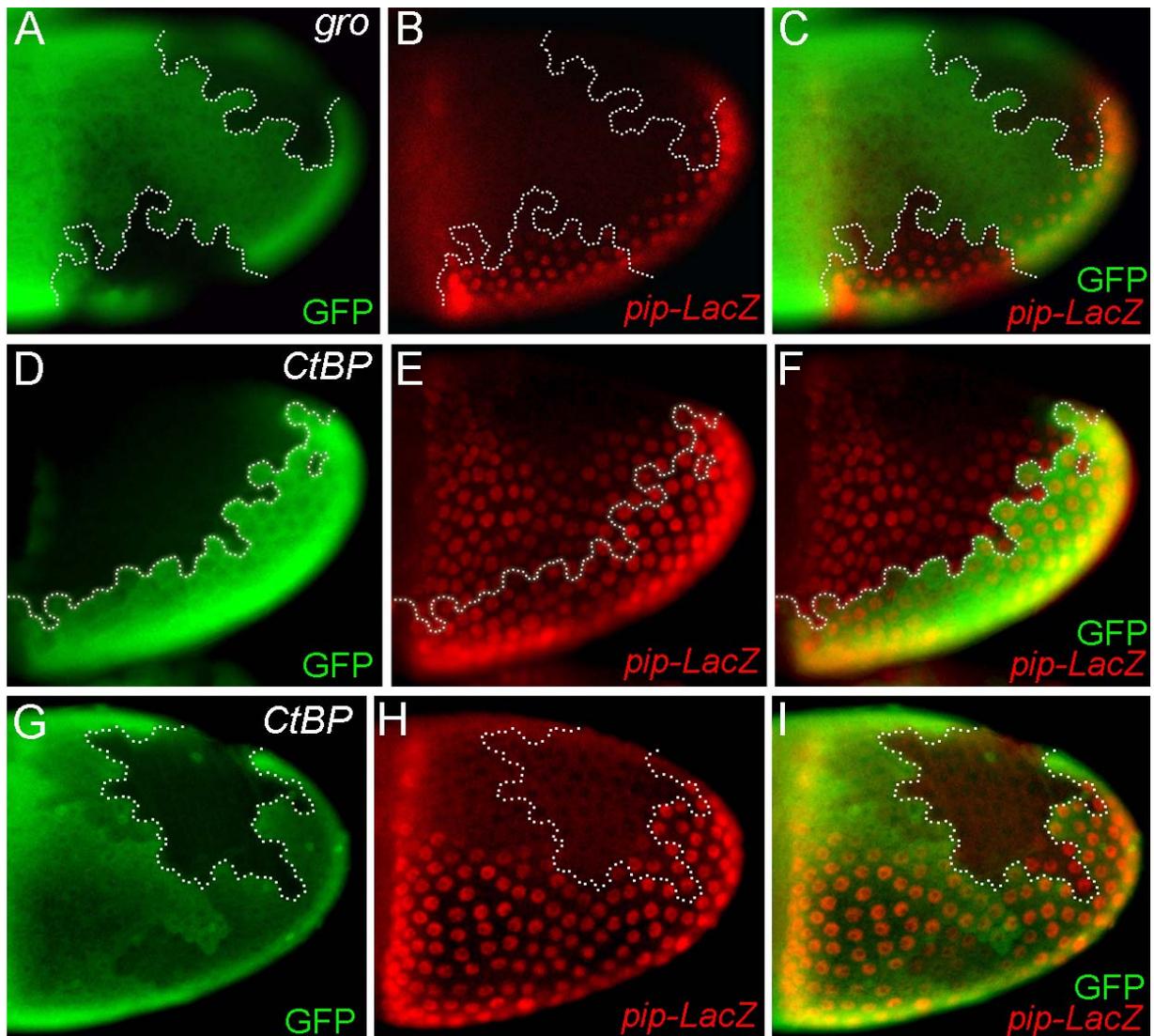


Abbildung 1.2.5.: Die Expression von *pipe* wird durch *gro*^{E48}- oder *CtBP*^{P1590}-mutante Follikelzellklone nicht beeinflusst. (A-I) Stadium 10 Eikammern. Mutante Zellklone sind jeweils durch die Abwesenheit von GFP (grün) markiert. Das mittels anti-βGal-Färbung sichtbar gemachte *pipe-LacZ*-Konstrukt (rot) spiegelt die Expression von *pipe* wieder. (A-C) ventral und dorsal lokalisierte *gro*^{E48}-Klone, (D-F) großer, von ventral bis dorsal reichender *CtBP*^{P1590}-Klon, (G-I) dorsaler lokalisierter *CtBP*^{P1590}-Klon.

In Bezug auf short-range-Repressoren ist der am besten untersuchte Corepressor CtBP (C-terminal binding protein). CtBP ist evolutionär hoch konserviert und die Funktion einer Vielzahl von Repressoren hängt zumindest teilweise von CtBP ab (Chinnadurai, 2002; Mannervik et al., 1999; Nibu et al., 1998; Poortinga et al., 1998). Kürzlich ist gezeigt worden, dass CtBP in seltenen Fällen auch als Kontext-abhängiger Co-Aktivator wirken kann, wobei unterschiedliche Regionen des Proteins für die aktivierende oder reprimierende Funktion verantwortlich sind (Fang et al., 2006). In *Drosophila* kommen verschiedene CtBP-Isoformen

vor, für die jedoch bisher keine deutlich unterschiedlichen Funktionen identifiziert worden sind (Fang et al., 2006; Mani-Telang and Arnosti, 2007; Sutrias-Grau and Arnosti, 2004).

Auch im Fall von CtBP wurde die *pipe-LacZ*-Expression in Eikammern untersucht, in denen mutante (*CtBP^{P1590}*) Follikelzellklone induziert wurden. Wie die Abbildung 1.2.5 D-I zeigt, konnte keine Veränderung des *pipe-LacZ*-Expressionsmusters beobachtet werden. Auch der alleinige Verlust von CtBP hat somit keinen Effekt auf die Expression von *pipe*.

1.2.1.6 Der Dpp-Signalweg ist nicht in die Regulation der *pipe*-Expression involviert

Decapentaplegic (Dpp) ist ein Mitglied der TGF- β /BMP Familie und spielt eine entscheidende Rolle bei der Achsenbildung des Embryos und bei der Musterbildung der Imaginalscheiben (Gelbart, 1989; Padgett et al., 1987; Spencer et al., 1982). Als Folge der Bindung von Dpp an den Typ-II-Rezeptor Punt (Pnt) und den Typ-I-Rezeptor Thickveins (Tkv) kommt es intrazellulär zur Phosphorylierung von Mothers against *dpp* (Mad), welches daraufhin mit Medea (Med) interagieren kann (Parker et al., 2004; Raftery and Sutherland, 1999; Wisotzkey et al., 1998). Der so gebildete Komplex gelangt in den Zellkern, wo er in Kombination mit weiteren Cofaktoren die Expression verschiedener Zielgene reguliert (Affolter et al., 2001; Feng and Derynck, 2005; Massague and Wotton, 2000).

Es ist gezeigt worden, dass Dpp in der Oogenese eine entscheidende Rolle bei der Musterbildung des Follikelepithels spielt, wobei es insbesondere eine globale Funktion in der Grk-abhängigen Spezifizierung aller dorsalen Follikelzell-Schicksale hat (Berg, 2005; Dobens et al., 2000; Peri and Roth, 2000; Shrivage et al., 2007; Twombly et al., 1996).

Die Überexpression von *dpp* in Follikelzellen führt zu einer Expansion der *pipe*-Expression, wobei sich dieser Effekt ausschließlich auf die posterioren Follikelzellen beschränkt und die *pipe*-Domäne in den restlichen Follikelzellen unverändert bleibt (Dissertationen Francesca Peri und Bhupendra Shrivage). Dabei ist zu beachten, dass gerade diese posterioren Zellen normalerweise kein *dpp* Signal empfangen. Die Veränderungen, die durch eine Überexpression von *dpp* bei der Musterbildung des dorsalen Follikelepithels auftreten, betreffen dagegen immer nur die Hauptkörperfollikelzellen und nie die posterioren Follikelzellen (Dissertation Bhupendra Shrivage). Die beobachtete Expansion der *pipe*-Expression am posterioren Ende der Eikammer hat zu der Vermutung geführt, dass der Dpp Signalweg eine aktivierende Rolle bei der Regulation der *pipe*-Expression spielt. Überraschenderweise hat im Widerspruch dazu Francesca Peri (Dissertation) in *Mad*-mutanten Follikelzellklonen eine schwache Hochregulierung der *pipe*-Expression beobachtet.

Um direkt zu untersuchen, ob der *dpp* Signalweg tatsächlich eine essentielle Rolle bei der Regulation der *pipe*-Expression spielt, haben wir sowohl *Med¹³*- (Abb. 1.2.6. A-F), als auch *tkv^{a12}*- (Abb. 1.2.6. G-I) mutante Follikelzellklone induziert und jeweils die Auswirkungen auf das *pipe-LacZ*-Expressionsmuster verfolgt. Dabei zeigt in beiden Fällen die erzeugte Inaktivierung des Dpp Signalweges in den mutanten Klonen keine Veränderung in der Stärke oder der räumlichen Ausdehnung der ventralen *pipe-LacZ*-Expressionsdomäne, weder posterior noch anterior (Abb. 1.2.6. A-I). Im Falle des *tkv^{a12}* Klons ist das vor allem an den einzelnen, GFP-markierten wildtypischen „Inselzellen“ innerhalb des Klons zu erkennen, die

im Vergleich zu den benachbarten Zellen keinen Unterschied in der Expressionsstärke erkennen lassen (Pfeile in Abb. 1.2.6.H).

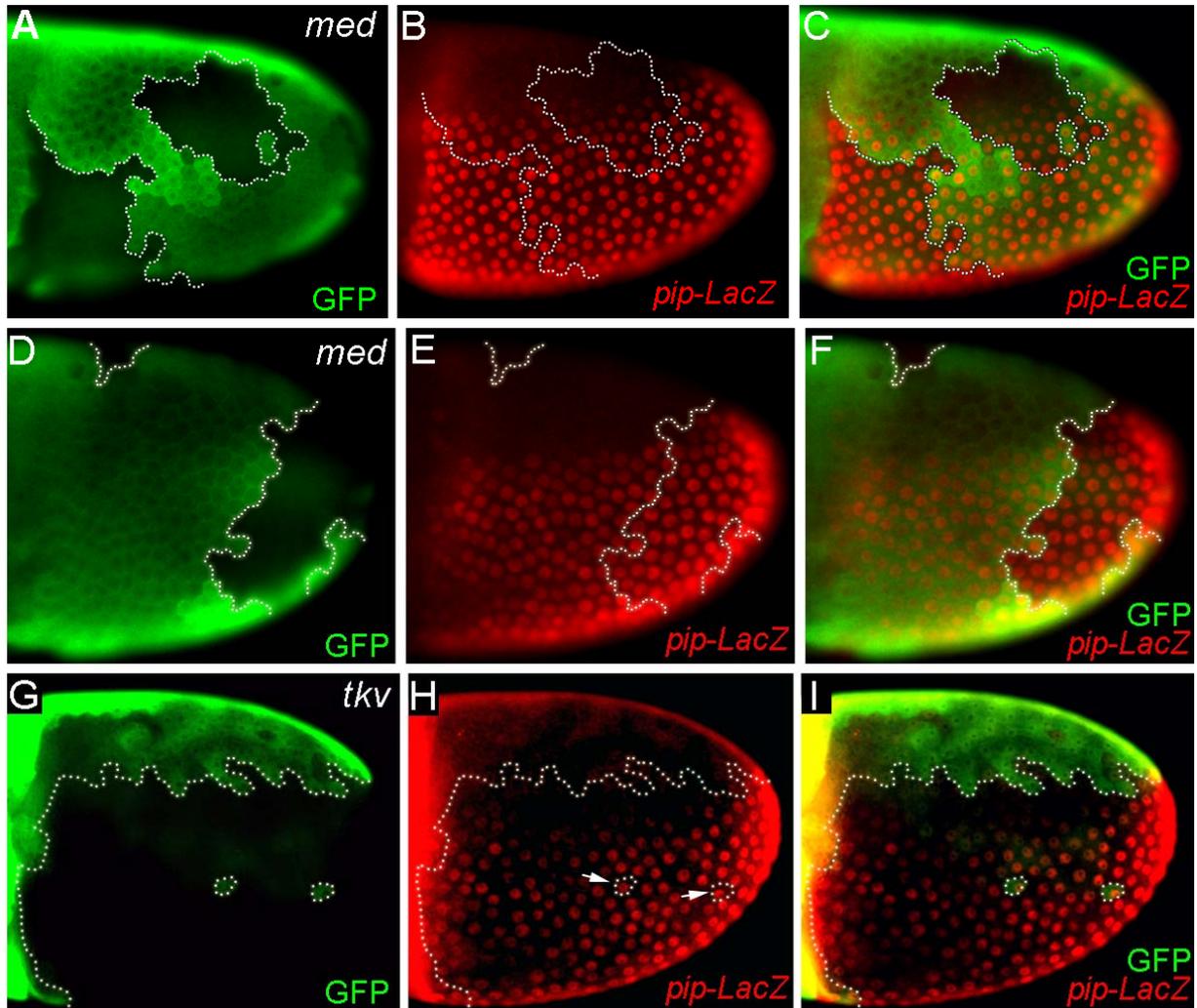


Abbildung 1.2.6.: Die Expression von *pipe* wird durch *Med*¹³- oder *tkv*^{a12}-mutante Follikelzellklone nicht beeinflusst. (A-I) Stadium 10 Eikammern. Mutante Zellklone sind jeweils durch die Abwesenheit von GFP (grün) markiert. Das mittels anti-βGal-Färbung sichtbar gemachte *pipe-LacZ*-Konstrukt (rot) spiegelt die Expression von *pipe* wieder. (A-C) anterior ventral und zentral lateral lokalisierte *Med*¹³-Klone, (D-F) posterior lokalisierter *Med*¹³ Klon, (G-I) großer, von ventral bis lateral reichender *tkv*^{a12}-Klon. In keinem Fall ist eine Veränderung des *pipe-LacZ*-Expressionsmusters innerhalb der Klone zu erkennen. Im Falle des *tkv*^{a12}-Klons zeigen insbesondere die beiden GFP markierten wildtypischen Inselzellen keine Abweichung in der Expressionsstärke im Vergleich zu den direkt benachbarten mutanten Zellen.

Molekulare und bioinformatische Analyse des *pipe*-Promotors

Um den *cis*-regulatorischen Bereich von *pipe* einzugrenzen, der für die ventrale Expression im Follikelepithel relevant ist, haben wir die Promotorregion mit Hilfe bioinformatischer Methoden analysiert. Ergänzend dazu haben wir Teilfragmente des Promotors vor ein *LacZ*-Reporter gen kloniert und die Expressionsmuster dieser Promotor-Konstrukte in transgenen Tieren untersucht.

Im folgenden Abschnitt stelle ich zunächst die bioinformatische Analyse dar, auf die von uns untersuchten Reporter-Konstrukte gehe ich erst weiter unten im Detail ein (Kapitel 1.2.3-4). Die Expressionsmuster von zwei Konstrukten, die der Ausgangspunkt für die bioinformatische Analyse waren, möchte ich allerdings hier schon kurz erwähnen. Während die proximalen 1500 bp der *pipe*-upstream-Sequenz eine ventrale Expression des Reportergens im wildtypischen *pipe*-Expressionsmuster bewirken, zeigt ein um 500 bp kleineres Fragment (1000 bp upstream *pipe*) eine uniforme Expression im gesamten Follikel-epithel (Abb. 1.2.7.). Diese ektopische Expression auf der dorsalen Seite der Eikammer, im Folgenden auch als Derepression bezeichnet, deutet auf essentielle TFBS in diesem Bereich hin, die insbesondere bei der EGFR-Signal-vermittelten, dorsalen Repression von *pipe* eine entscheidende Rolle spielen.

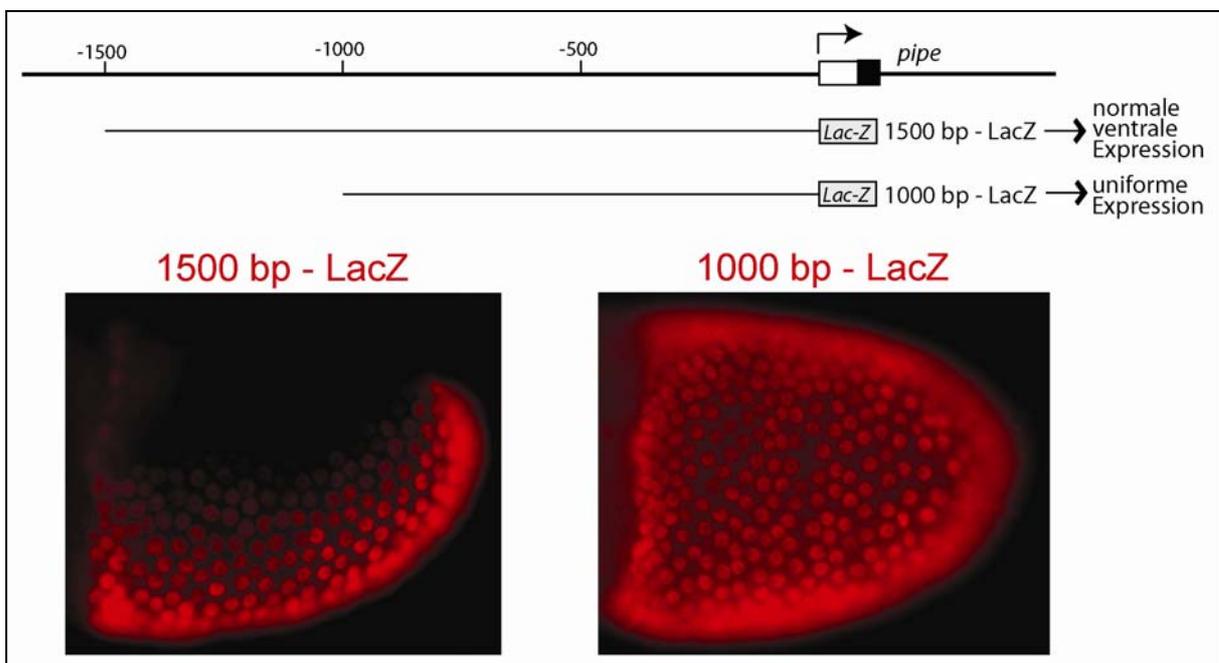


Abbildung 1.2.11.: Die Expressionsmuster der *pipe*-Promotor-*LacZ* Konstrukte 1500 bp – *LacZ* und 1000 bp – *LacZ*. Das Diagramm zeigt einen Ausschnitt der genomischen Region, die den Transkriptionsstart von *pipe* flankiert (+500 bis ca. -1500); der Transkriptionsstart ist durch den Pfeil markiert. Darunter ist der Bereich durch schwarze Linien markiert, der in den Reporterkonstrukten 1500bp-*LacZ* und 1000bp-*LacZ* vor das *LacZ*-Reportergen fusioniert ist. Gezeigt sind außerdem Lateralansichten anti- β Gal gefärbter Eikammern transgener Weibchen, die jeweils eines der o.g. Konstrukte tragen (s. auch Abb. 1.2.20.). Das 1500bp-*LacZ* wird in einem zur Expression des endogenen *pipe* identischen Muster exprimiert, das 1000bp-*LacZ* Konstrukt zeigt eine uniforme Expression in der gesamten Eikammer (dorsale Derepression).

1.2.2 Bioinformatische Analyse der *cis*-regulatorischen Region von *pipe*

Aufgrund der Verfügbarkeit der sequenzierten Genome unterschiedlicher *Drosophiliden*, haben wir uns bei der bioinformatischen Promotor-Analyse insbesondere auf einen phylogenetischen Ansatz konzentriert (phylogenetic footprinting). Inzwischen sind die Genome von 11 *Drosophiliden* – zusätzlich zu *D. melanogaster* – vollständig sequenziert und verfügbar (siehe Einleitung, Abb. 1.1.1.). Jedoch ist hierzu zu beachten, dass zum Zeitpunkt der Durchführung eines Großteils der Analyse nur sechs Genome vollständig zur Verfügung

standen (*D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. mojavensis*, *D. virilis*), so dass insbesondere bei der Benutzung der TFBS-Vorhersage-Programme nur mit diesen *Drosophiliden* gearbeitet wurde. Dabei zeigte sich jedoch in später erneut durchgeführten Test-Läufen der einzelnen Programme mit zusätzlichen Sequenzen keine deutliche Veränderung der ursprünglich gewonnenen Ergebnisse.

Es wurden von uns drei unterschiedliche Arten von Programmen für die bioinformatische Analyse verwendet. Zunächst haben wir mit Hilfe von Alignment-Programmen die Konservierung innerhalb der 1,5 kb des upstream-Bereiches untersucht (Kapitel 1.2.2.1), der in Reporterkonstrukten zu einer wildtypischen Expression des Reportergens führt (s.o. Abb. 1.2.11.). Danach haben wir mit Lwf-Scan ein Programm verwendet, welches unabhängig von der Konservierung der statistischen Identifizierung *cis*-regulatorischer Module dient (Kapitel 1.2.2.2). Im letzten Schritt haben wir dann verschiedene Programme benutzt, die der Vorhersage potentieller *cis*-regulatorischer Motive, und somit der direkten Identifizierung individueller TFBS dienen (Kapitel 1.2.2.3). Bei allen in den folgenden Kapiteln gezeigten Abbildungen ist zu beachten, dass *pipe* auf dem Minus-Strang codiert ist, so dass jeweils die dem Promotor am nächsten gelegene Sequenz links lokalisiert ist und weiter distale Bereiche rechts davon liegen.

1.2.2.1 Phylogenetic Footprinting mit Hilfe unterschiedlicher Alignment-Software

Zur Analyse der Konservierung innerhalb der *cis*-regulatorischen Region von *pipe* haben wir die Ergebnisse verschiedener Alignment-Programme miteinander verglichen, die jeweils unterschiedliche Algorithmen zur Erstellung der Alignments verwenden.

Folgende Programme/Algorithmen wurden verwendet:

ClustalW (Thompson et al., 1994) zur Erstellung eines globalen, multiplen Alignments.

UCSC Genome Browser (Kent et al., 2002). Stellt für die gesamte Sequenz von *D. mel.* die Konservierung graphisch dar. Die zugrunde liegenden Alignments werden in diesem Fall durch das Programm **MULTIZ** erstellt, welches unter Verwendung des **TBA (Threaded Blockset Aligner)** Algorithmus (Blanchette et al., 2004), ausgehend von mittels **BLASTZ** (Schwartz et al., 2003) erstellten lokalen Alignments, globale Alignments erzeugt. Zur mathematischen Identifizierung konservierter Elemente innerhalb dieser multiplen Alignments verwendet der UCSC Genome Browser außerdem den so genannten **PhastCons** Algorithmus (Siepel et al., 2005).

GenomeVISTA (Bray et al., 2003; Couronne et al., 2003; Kent, 2002). Ermöglicht in der aktuellen Version die Erstellung paarweiser Alignments von 7 verschiedenen *Drosophiliden* (*D. sim.*, *D. yak.*, *D. errec.*, *D. ana.*, *D. pseu.*, *D. moj.*, *D. vir.*) mit dem *D. mel.* Referenzgenom. Dazu werden zunächst unter Verwendung des **BLAT** Algorithmus (Kent, 2002) lokale Alignments erzeugt, von denen ausgehend mit Hilfe des Programms **AVID** (Bray et al., 2003; Couronne et al., 2003) ein globales Alignment erstellt wird.

bayes aligner („bayes aligner web application for phylogenetic footprinting“, http://bayesweb.wadsworth.org/cgi-bin/bayes_align12.pl). Dient speziell der Analyse paarweiser Alignments *cis*-regulatorischer Regionen. Die Alignments werden durch den „**Bayes block**

aligner“ Algorithmus (Zhu et al., 1998) erstellt, der eine bayes'sche („Bayesian“) Variante des klassischen Smith-Waterman Algorithmus (Smith and Waterman, 1981) verwendet. Weil die jeweils erzeugten Alignments insgesamt sehr ähnlich sind, zeige ich in der folgenden Abbildung (1.2.12., nächste Seite) nur die Darstellung der 1,5 kb upstream-*pipe*-Region, inklusive des ersten Exons, die man mit Hilfe des UCSC Genome Browsers erhält. Da sich die mit Hilfe von GenomeVISTA erstellten paarweisen Alignments auch innerhalb des UCSC Genome Browsers darstellen lassen, habe ich auch diese mit in die Abbildung aufgenommen. Die Ergebnisse des bayes aligners und das ClustalW-Alignment ist im Anhang 5.1 aufgeführt. In der Abbildung ist durch einen gelben Rahmen der Sequenz-Bereich markiert, der für die weiter unten beschriebenen TFBS-Vorhersage-Programme (1.2.2.3) verwendet wurde. Außerdem ist die Lage der, mit Hilfe dieser Programme identifizierten, *cis*-regulatorischen Motive (Motiv A, B und C, s. Abb. 1.2.14.-1.2.17.) eingezeichnet.

Mit dem UCSC Genome Browser lassen sich verschiedene Informationen bezüglich einer genomischen Region in Form einzelner, so genannter tracks anzeigen. Die ersten sieben tracks im oberen Teil der Abbildung 1.2.12. stellen die Graphen der paarweisen GenomeVISTA-Alignments dar. Konservierte Bereiche sind jeweils durch eine Färbung unterhalb der Kurven hervorgehoben, wobei blau für translatierte codierende Regionen verwendet wird, türkis für nicht-translatierte codierende Regionen (siehe erstes *pipe*-Exon) und rot für konservierte nicht-codierende Bereiche. Welche Bereiche koloriert werden hängt, dabei von benutzerdefinierten Werten zur minimalen prozentualen Identität und zur minimalen Länge der konservierten Region ab. Wir haben die vorgegebenen Standardwerte verwendet (70%/100bp). Man erkennt, dass neben der Sequenz des ersten Exons und der unmittelbar upstream gelegenen *cis*-regulatorischen Region nur der Bereich von ca. 1035-1125 bp upstream bis hinab zu den ~40 Mio. Jahre entfernten *Drosophiliden* *D. moj* und *D. vir.* konserviert ist. Für das Alignment mit *D. moj.* wird in diesem Falle (neben der Markierung des Exons) tatsächlich nur für den Bereich um 1100 bp upstream ein konserviertes nicht-codierendes Element vorhergesagt. Insgesamt spiegelt die Darstellung der paarweisen Alignments sehr deutlich die abnehmende Homologie der Sequenzen mit zunehmendem evolutionärem Abstand wider. Der nächste UCSC Genome Browser track darunter, stellt in blau den transkribierten Teilbereich des *pipe*-Gens in dieser Region dar, wobei der nicht codierende Bereich des Ersten Exons schmaler dargestellt ist, als der darauf folgende codierende Abschnitt. Direkt darunter sind in diesem Beispiel zwei tracks zu sehen, die Informationen zur Konservierung innerhalb dieser Region graphisch darstellen. Dabei wurden alle 11 derzeit verfügbaren *Drosophiliden* Genome zusätzlich zu *D.mel.* berücksichtigt. Zur Identifizierung konservierter Elemente innerhalb des multiplen MULTIZ-Alignments verwendet der UCSC Genome Browser den PhastCons-Algorithmus (Siepel et al., 2005). Der mittels PhastCons errechnete Grad der Konservierung ist zunächst als durchgehender Plot entlang der gesamten Sequenz abgebildet, wobei eine hohe Konservierung durch einen entsprechend starken Peak wiedergespiegelt wird. Darunter zeigt der Konservierungs-track außerdem eine graphische Darstellung des MULTIZ-Alignments. Dabei steht die dunkelste (schwarze) Schattierung der Balken für höchste BLASTZ-Werte und weiße Bereiche zeigen an, dass kein Alignment vorliegt.

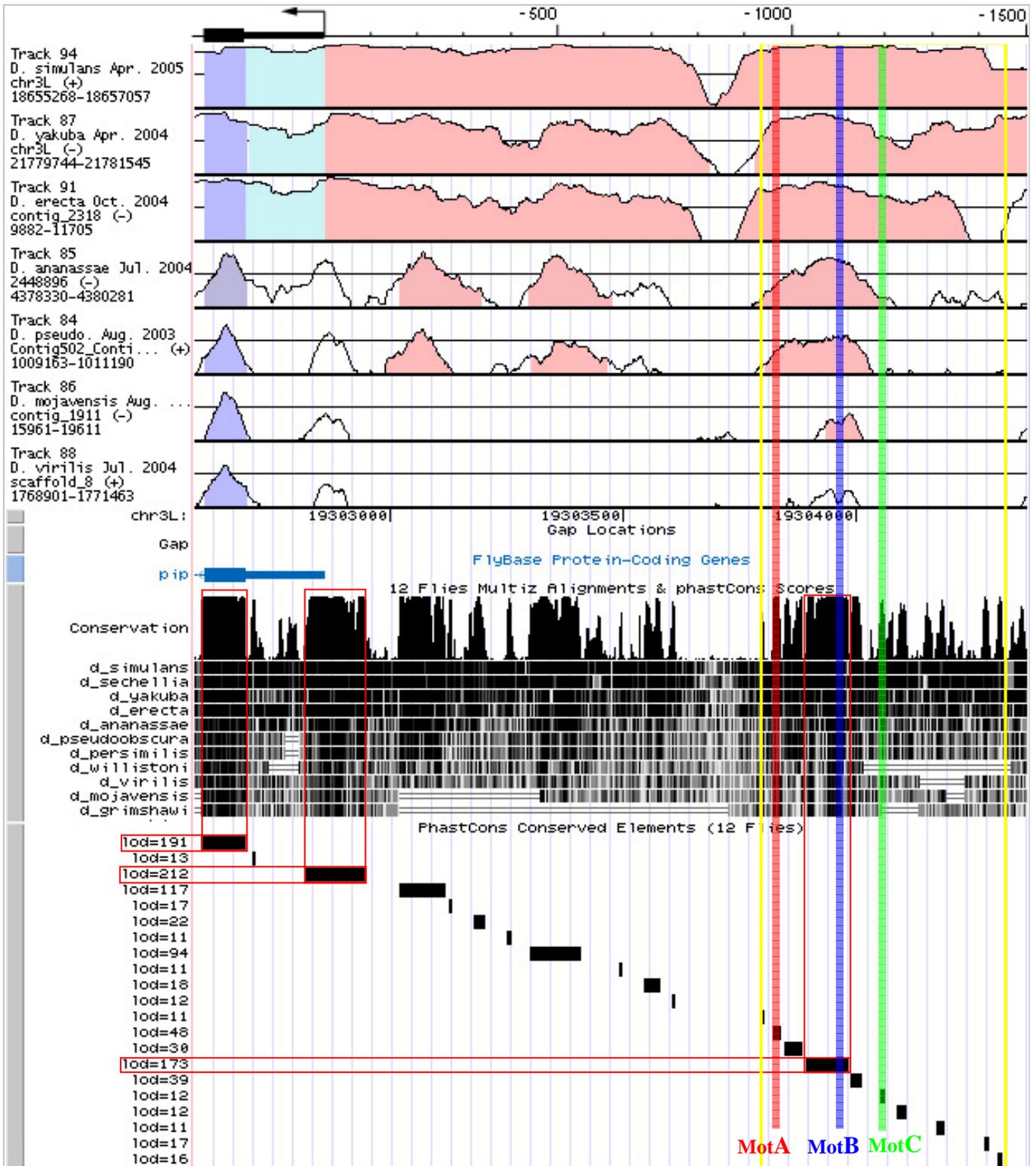


Abbildung 1.2.12: Darstellung der Konservierung der *pipe*-Promotor-Region durch den UCSC Genome Browser. Im oberen Teil sind die mittels GenomeVISTA erstellten, paarweisen Alignments gezeigt, links ist jeweils angegeben, welche *Drosophila*-Spezies mit *D.mel.* aligniert wurde, oberhalb der Diagramme sind die Koordinaten der *pipe*-upstream-Region angezeigt. Die Graphen zeigen die Konservierungen über 50% an, die obere Linie markiert 100% Konservierung. Konservierte translatierte Regionen sind blau, nicht-translatierte codierende Regionen türkis, nicht-codierende Bereiche rot markiert (70% min. Identität/100bp min. Länge der konservierten Region). Unterhalb der VISTA-Alignments ist in blau der transkribierte Bereich des *pipe*-Gens in dieser Region gezeigt. Darunter ist ein MULTIZ-Alignment für 12 *Drosophiliden* gezeigt; oberhalb des Alignments zeigt ein Plot der PhastCons-Werte den Grad der Konservierung an. Ganz unten ist die Lage der mit Hilfe von PhastCons vorhergesagten konservierten Elemente markiert, links ist jeweils der zugehörige log-odds score (lod) angezeigt. Die drei Bereiche mit der höchsten Konservierung sind durch rote Rahmen markiert. Der gelbe Rahmen markiert den ~500 bp Bereich, der für die nachfolgende Analyse mittels TFBS-Vorhersage-Programmen (s.u., 1.2.2.3) verwendet wurde. Die Lage der mit Hilfe dieser Programme identifizierten Motive A-C (Abb. 1.2.14.-1.2.17.) ist durch farbige Balken gekennzeichnet.

In einem separaten track („PhastCons Conserved Elements“) ist schließlich ganz unten zusätzlich die Lage vorhergesagter konservierter Elemente durch schwarze Balken markiert, wobei jeweils ganz links der zugehörige log-odds score (Iod) angezeigt wird. Je höher der Iod-Wert ist, desto stärker die von PhastCons ermittelte Konservierung. Der höchste Iod-Wert (Iod=212) ergibt sich für eine Region von 140 bp, zu der ein Teil des nicht codierenden Bereichs des ersten Introns gehört, sowie ca. 95 bp der direkt upstream gelegenen Sequenz, welche die eigentliche core-Promotorregion umfasst. Daneben zeigt, zusätzlich zur codierenden Sequenz des ersten Exons (Iod=191), innerhalb der *cis*-regulatorischen Region der Bereich von ca. 1035-1125 bp upstream mit einem Wert von Iod=173 die höchste Konservierung. Dieser Bereich liegt innerhalb der 500 bp Region, die in dem ektopisch exprimierten 1000-*LacZ* Reporterkonstrukt im Vergleich zum 1500-*LacZ* Konstrukt fehlt (Abb. 1.2.11.).

Aufgrund der hohen Konservierung bis hin zu *D. pseu.*, haben wir für die Identifizierung von TFBS nicht den exakten 1000-1500bp Abschnitt eingesetzt, der durch die Analyse der Reporterkonstrukte als relevant identifiziert worden war, sondern einen etwas weiter nach proximal verschobenen Bereich (-936 bis -1453 bp upstream des Transkriptionsstartes, siehe gelber Rahmen in Abb. 1.2.12.). Auf die in der Abbildung markierte Lage der vorhergesagten Motive A-C gehe ich erst nach der Besprechung der TFBS-Vorhersage-Programme ein.

1.2.2.2 Lwf-Scan: Vorhersage potentieller *cis*-regulatorischer Module (CRM)

Das Programm Lwf-Scan (Nazina and Papatsenko, 2003) dient der Identifizierung *cis*-regulatorischer Module oder Enhancer. Lwf-Scan führt auf der Grundlage eines Trainings-Satzes, der annotierte Sequenz-Daten für die meisten bekannten *cis*-regulatorischen Module von *Drosophila* enthält, eine umfassende Analyse der Verteilung von lokalen Wort-Häufigkeiten (local word frequencies) durch. Vom methodischen Ansatz ähnelt Lwf-Scan den im nächsten Abschnitt behandelten TFBS-Vorhersage-Programmen, da es sich auch um ein *ab initio*-Vorhersage Programm handelt, welches prinzipiell nach einer ungewöhnlichen Basenzusammensetzung der zu analysierenden Sequenz sucht. Lwf-Scan identifiziert jedoch keine individuellen *cis*-regulatorischen Motive (oder TFBS), sondern sagt für einen größeren Sequenzabschnitt die Wahrscheinlichkeit voraus, dass es sich um eine *cis*-regulatorische Region handelt. Außerdem gehen in die Analyse mittels Lwf-Scan keine phylogenetischen Daten ein.

Als Input diene in diesem Fall die 1,5 kp *pipe*-upstream Sequenz von *Drosophila melanogaster*. Das Ergebnis lässt sich mit Hilfe des Programms Gnuplot (<http://www.gnuplot.info/>) in Form eines Graphen darstellen, der über die gesamte Länge der Input Sequenz hinweg die Wahrscheinlichkeit eines vorliegenden *cis*-regulatorischen Moduls anzeigt. Abbildung 1.2.13. zeigt das Ergebnis für die *pipe*-upstream-Region. Das Diagramm offenbart drei deutliche Peaks, zwei kleinere an den ungefähren Positionen 300 und 1400, und einen sehr stark ausgeprägten, breiten Peak zwischen Position 900 und 1200, mit einem Maximum bei ungefähr 1050. Dieser letztgenannte, besonders stark ausgeprägte Peak, liegt innerhalb des experimentell als relevant ermittelten 500 bp Bereichs (Abb. 1.2.11.) und korreliert mit der beobachteten hohen Konservierung in diesem Abschnitt.

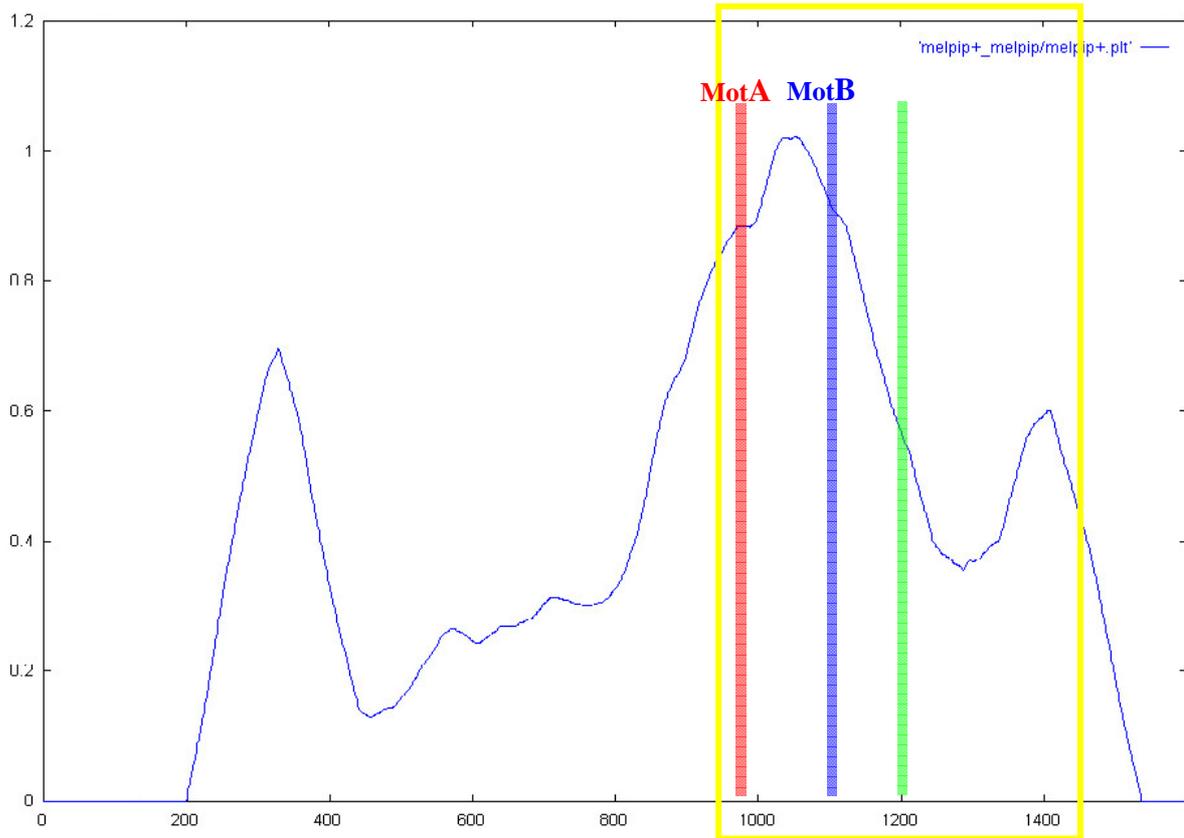


Abbildung 1.2.13.: Graphische Darstellung des Lwf-Scan-Ergebnisses für die 1,5 kb upstream-*pipe*-Region. Der Graph zeigt die Wahrscheinlichkeit eines vorliegenden *cis*-regulatorischen Moduls für jede Basenposition. Der gelbe Rahmen markiert den ~500 bp Bereich, der für die nachfolgende Analyse mittels TFBS-Vorhersage-Programmen verwendet wurde (s. u., Kapitel 1.2.2.3). Die Lage der mit Hilfe dieser Programme identifizierten Motive A-C (s. Abb. 1.2.14.-1.2.17.) ist durch farbige Balken gekennzeichnet.

1.2.2.3 Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindemotive mit Hilfe von *ab initio*-Vorhersage-Programmen

Die oben aufgeführten Expressionsmuster des 1000bp-*LacZ* und des 1500bp-*LacZ* Konstrukts (Abb. 1.2.11.), zeigen das Vorhandensein einer Repressor-Bindestelle in einem Bereich von -1kb bis -1,5kb upstream von *pipe* an. Bei der bioinformatischen Suche nach TFBS haben wir uns auf die Identifizierung dieser Repressor-Bindestelle konzentriert, da der an diese Stelle bindende Repressor sehr wahrscheinlich durch den EGFR-Signalweg reguliert wird. Wie die oben dargestellten Ergebnisse demonstrieren, liegen innerhalb dieser Region auch ein besonders hoch konservierter Sequenzabschnitt (Abb. 1.2.12), sowie ein potentielles *cis*-regulatorisches Modul (Abb. 1.2.13.).

Für die Suche nach TFBS sind inzwischen weit über hundert Programme verfügbar. Da wir den Transkriptionsfaktor, der für die EGFR-vermittelte Repression von *pipe* verantwortlich ist, nicht kennen, und wir deshalb für diesen Transkriptionsfaktor keine Konsensus-Bindestelle zur Verfügung hatten, konnten wir nur solche Programme benutzen, bei denen keine Information bezüglich der Bindestellen als Input benötigt wird (*ab initio*-Vorhersage, siehe

Einleitung). Allen von uns verwendeten Programmen ist außerdem gemeinsam, dass die Suche nach TFBS auf diejenigen Motive eingeschränkt wird, die zwischen mehreren Spezies konserviert sind (phylogenetic footprinting). Wir haben mehrere Programme parallel verwendet, und uns auf diejenigen Motive konzentriert, die von mehreren unterschiedlichen Programmen vorhergesagt wurden. Der systematische Vergleich verschiedener Vorhersage-Programme hat gezeigt, dass dieser Ansatz in der Tat zu einer deutlichen Verbesserung bei der Identifizierung echter TFBS führt (Tompa et al., 2005). Zunächst wurden verschiedene Programme von uns getestet und miteinander verglichen und schließlich einige wenige Programme ausgewählt, die unterschiedliche Algorithmen verwenden und die sich als am besten geeignet erwiesen haben. Im Folgenden stelle ich diese Programme ganz kurz vor, eine ausführlichere Darstellung, inklusive konkreter Angaben zu den von uns verwendeten Einstellungen, ist im Anhang zu finden (Anhang 5.2.).

MOST

Das Programm MOST (Motifs Searching Tool (Pizzi et al., 2005)) sucht, auf der Grundlage einer ungewöhnlichen Basen-Zusammensetzung im Vergleich zur Hintergrund-Basenhäufigkeit, nach *cis*-regulatorischen Motiven in einer Gruppe von DNA-Sequenzen. MOST erlaubt dabei für den Kernbereich der Motive ein geringeres Maß an Variabilität, als für die Randbereiche, was dem häufig gefundenen Aufbau tatsächlicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen entspricht. Eine weitere Besonderheit dieses Programms ist die Unterteilung der Analyse in mehrere Einzelschritte, wobei nach jedem Schritt die Möglichkeit besteht, die Ergebnisse zu evaluieren und für den nachfolgenden Schritt zu selektieren. Innerhalb der eingegeben Sequenzen wird zunächst nach ungewöhnlichen („most surprising“) exakten Mustern („Wörtern“) gesucht. Im nächsten Schritt werden diese einem Clustering unterzogen, um ähnliche „Wörter“ zu Kern-Motiven in Form von Konsensussequenzen zusammenzufassen, welche abschließend zu größeren Motiven („extended motifs“) erweitert werden.

SOMBRERO

SOMBRERO (Self-Organizing Map for Biological Regulatory Element Recognition and Ording, (Mahony et al., 2005a; Mahony et al., 2005b) verwendet für die Suche nach überrepräsentierten Motiven einen Lernalgorithmus, der ursprünglich zur Konstruktion künstlicher neuronaler Netze entwickelt wurde, und als „Selbstorganisierende Karte“ (Self Organizing Map/SOM) bezeichnet wird. SOMBRERO benutzt damit einen grundlegend anderen Ansatz als die meisten anderen Programme, die jeweils unterschiedliche Verfahren aus den Bereichen der Wahrscheinlichkeitstheorie und der statistischen Physik benutzen, wie EM-Algorithmen (z. B. MEME) oder Gibbs Sampling (z. B. AlignACE, MotifSampler).

WeederH

WeederH (Pavesi et al., 2007) identifiziert konservierte TFBS in einer Referenzsequenz durch den Vergleich mit homologen Sequenzen. Der WeederH Algorithmus ermittelt dazu nicht die absolute Konservierung, sondern die relative Konservierung in Bezug auf die durchschnittliche Konservierung der Gesamtsequenzen. Zusätzlich zu der Konservierung der Sequenz berücksichtigt WeederH die Konservierung in Bezug auf die exakte Position. Das

Programm kann maximal vier homologe Sequenzen zum Vergleich mit der Referenzsequenz (in unserem Fall *D. mel.*) verarbeiten. Aufgrund der Erfahrung mit den bis dahin verwendeten Programmen, haben wir uns in diesem Fall für die Sequenzen der folgenden Spezies entschieden: *D. yak.*, *D. errec.*, *D. anan.*, *D. pseu.*.

CREDO

Die Software CREDO (Hindemitt and Mayer, 2005) bietet die Möglichkeit, eine Reihe von Sequenzen parallel von fünf verschiedenen Algorithmen zur Identifizierung von TFBS einzusetzen und erleichtert dadurch den direkten Vergleich der Ergebnisse. Die folgenden Programme lassen sich via CREDO verwenden: AlignACE, DiAlign, FootPrinter, MEME und MotifSampler. MEME (Bailey and Elkan, 1994) basiert auf einem EM-Algorithmus (Expectation-Maximization) und verwendet ein deterministisches Optimierungsverfahren. DIALIGN und Footprinter basieren primär auf der Konservierung von Sequenzbereichen. Dazu erzeugt DIALIGN lokale multiple Alignments (Morgenstern, 1999; Morgenstern, 2004) und FootPrinter wendet auf der Grundlage eines phylogenetischen Stammbaumes einen spezifischen phylogenetic footprinting Algorithmus an (Blanchette and Tompa, 2003). AlignACE verwendet für die Suche nach überrepräsentierten Motiven einen Gibbs-Sampling-Algorithmus (Hughes et al., 2000) und MotifSampler erweitert die Gibbs-Sampling-Methode durch die Modulierung des Hintergrundes mit einem Markov-Modell höherer Ordnung (Thijs et al., 2001).

Die einzelnen Programme wurden zusätzlich jeweils auch von der originalen Internetseite aus (unter Verwendung der jeweiligen Standardparameter) getestet. Dabei wichen nur im Falle von MEME die Ergebnisse deutlich von den mit Credo erhaltenen Resultaten ab. Diese Abweichungen kommen dadurch zustande, dass Credo speziell im Falle von MEME die Zahl der gesuchten Motive auf vier eingrenzt und von jedem Motiv maximal zwei individuelle Bindestellen pro Sequenz anzeigt.

1.2.2.4 Auswertung und Vergleich der TFBS-Vorhersage-Programme

Ausgangspunkt für die Gesamtauswertung der Resultate der verschiedenen Programme, war das Ergebnis der CREDO-Software, da wir hier direkt die Übereinstimmungen für fünf unterschiedliche Programme ansehen konnten.

Die Abbildung 1.2.14. zeigt die Darstellung der CREDO-Ergebnisse für die Sequenz von *D. mel.*. Man erhält eine derartige Darstellung für jede der Input-Sequenzen, so dass auch ein direkter Vergleich zwischen den getesteten Spezies möglich ist. Eine Übersichts-Grafik (Motif Overview) demonstriert alle gefundenen Motive auf einen Blick. Die individuellen Bindestellen für die einzelnen Konsensusmotive sind in jeweils einer eigenen Zeile für jedes Programm getrennt aufgeführt. Unterhalb der graphischen Darstellung der Positionen identifizierter Bindestellen wird in Form eines Diagramms eine Zusammenfassung der vorhergesagten Motive aller Programme für jede Basen-Position ausgegeben (Summary View). Diese Darstellung ermöglicht auf einen Blick die Identifizierung der Sequenz-Regionen, an denen die Ergebnisse verschiedener Algorithmen übereinstimmen oder

überlappen. Ein Farbcode gibt dabei an, wie viele Programme ein Motiv an der entsprechenden Position vorhersagen.

CREDO identifiziert innerhalb der 500 bp *D.mel.*-Region vier Bereiche, in denen die Vorhersagen von mindestens drei Programmen übereinstimmen oder überlappen, zwei davon zeigen sogar eine vierfache Übereinstimmung. Ein auffälliger Bereich liegt ungefähr zwischen Position 140 und 270 (entspricht Position -1075 bis -1205 upstream des Transkriptionsstartes), da sich in dieser Region besonders viele, fast durchgehend von mindestens zwei Programmen gefundene Motive befinden.

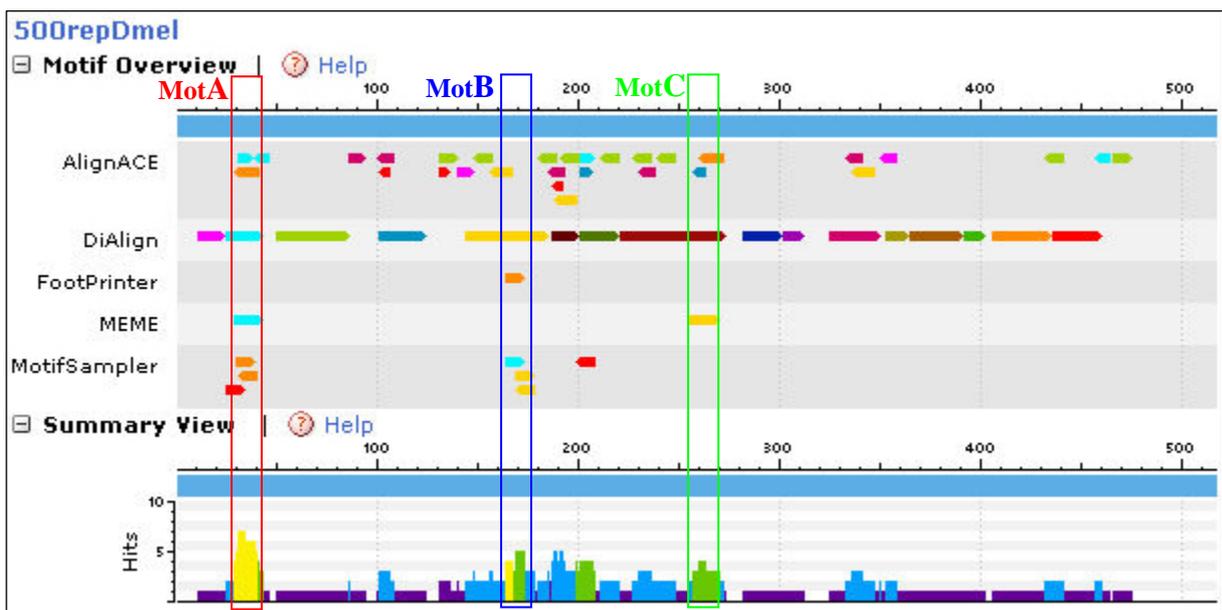


Abbildung 1.2.14.: Darstellung der CREDO-Gesamtauswertung. In der Motiv-Übersicht (Motif Overview) oben ist die Lage aller gefundenen Motive schematisch dargestellt. Die individuellen Bindestellen für die einzelnen Konsensusmotive sind in jeweils einer eigenen Zeile für jedes Programm getrennt aufgeführt und als farbige Pfeile dargestellt. Jedem Motiv wird eine Farbe zugeordnet, so dass sich verschiedene Bindestellen desselben Motivs identifizieren lassen. Das Diagramm (Summary View) darunter zeigt eine Zusammenfassung aller gefundenen Motive für jede Basen-Position. Ein Farbcode gibt an, wie viele Programme ein Motiv an der entsprechenden Position vorhersagen (lila – ein Programm, blau – zwei Programme, grün – drei Programme, gelb – vier Programme, rot – fünf Programme). Die Höhe der Peaks zeigt an, wie viele Motive an der jeweiligen Position gefunden wurden (einige Programme ermitteln mehrere überlappende Motive für eine Position). Die Lage der unter Eibeziehung der Ergebnisse von MOST, SOMBRERO und WeederH insgesamt von den meisten Programmen übereinstimmend identifizierten Motive A-C (Abb. 1.2.15-1.2.17.) ist durch farbige Rahmen gekennzeichnet.

Wir haben für die Sequenzbereiche, die eine Überlappung oder Übereinstimmung für mindestens drei Programme zeigen (gelber und grüner Farbcode in Abb. 1.2.14), untersucht, welche Motive anderer Programme ebenfalls für diese Bereiche eine Bindestelle identifizieren. Dazu haben wir jeweils mit Hilfe der ermittelten Motiv-Konsensussequenz eine Suche innerhalb der *D. mel.* Sequenz durchgeführt. Wir haben schließlich drei potentielle *cis*-regulatorische Motive identifiziert, die von mindestens fünf unterschiedlichen Programmen vorhergesagt werden. Diese Motive bezeichne ich im Folgenden als Motiv A, B und C. Die Lage dieser Motive ist in Abbildung 1.2.15 angegeben, einmal in einer schematischen

Darstellung der *pipe*-upstream-Region (oben in der Abbildung), und einmal durch farbige Hervorhebung innerhalb der Sequenz. Außerdem ist in der Abbildung angegeben, von welchen Programmen die Motive jeweils gefunden wurden. Ein Motiv (Motiv B, blau in Abb. 1.2.15.) sticht dabei besonders hervor, da es von allen verwendeten acht Programmen identifiziert wurde. Die anderen beiden Motive wurden von sieben (Motiv A – rot), bzw. fünf (Motiv C – grün) Programmen angezeigt. Die Lage der Motive A-C ist auch in der Abbildung der von GenomeVISTA und dem UCSC Genome Browser erstellten Alignments eingezeichnet (Abb. 1.2.12.). Dabei fällt auf, dass das Motiv B in einem besonders hoch konservierten Bereich liegt und selbst hoch konserviert ist (bis hin zu den ~40 Mio. Jahre entfernten Spezies *D. moj* und *D. vir.*). Die geringste Konservierung zeigt das Motiv C, wodurch verdeutlicht wird, dass die Identifizierung eines Motivs durch mehrere Programme nicht allein auf der hohen Konservierung beruht (in großen Teilen der Sequenz, die höher konserviert sind als das Motiv C, finden sich keine übereinstimmend vorhergesagten Motive). Für die Motive A und C ist insbesondere zu beachten, dass drei von insgesamt sieben Programmen diese beiden Motive als zwei unterschiedliche Versionen ein und desselben (Konsensus-)Motivs behandelt haben (AlignACE, MEME, SOMBRERO). Die anderen Programme haben dagegen entweder nur das Motiv A erkannt (MotifSampler und WeederH) oder jeweils individuelle Motive für Motiv A und C identifiziert (DiAlign, MOST und MEME bei der Verwendung via Credo).

Die unterschiedliche Behandlung der Motive A und C macht deutlich, wie sehr sich die Versionen, die von unterschiedlichen Programmen für ein Motiv generiert werden, unterscheiden. Der Hauptunterschied liegt dabei in der Variabilität der Konsensussequenz, die jeweils für ein Motiv erstellt wird. Direkt damit verbunden sind zwei Hauptunterscheidungsmerkmale von TFBS-Vorhersage-Programmen, nämlich die Spezifität und die Sensitivität der Vorhersagen. Eine hohe Spezifität verringert den Anteil falsch positiver Vorhersagen (false positives), allerdings ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass Motive nicht detektiert werden (mehr false negatives), die höhere Spezifität führt also zu einer geringeren Sensitivität und umgekehrt. Dabei sind die ermittelten Motive im Fall hoher Spezifität (und geringer Sensitivität) von geringerer Variabilität, als im umgekehrten Fall. Bei der unterschiedlichen Spezifität der Motive spielt auch die unterschiedliche Länge der Motive eine Rolle, da die Spezifität mit der Länge des Motivs zunimmt.

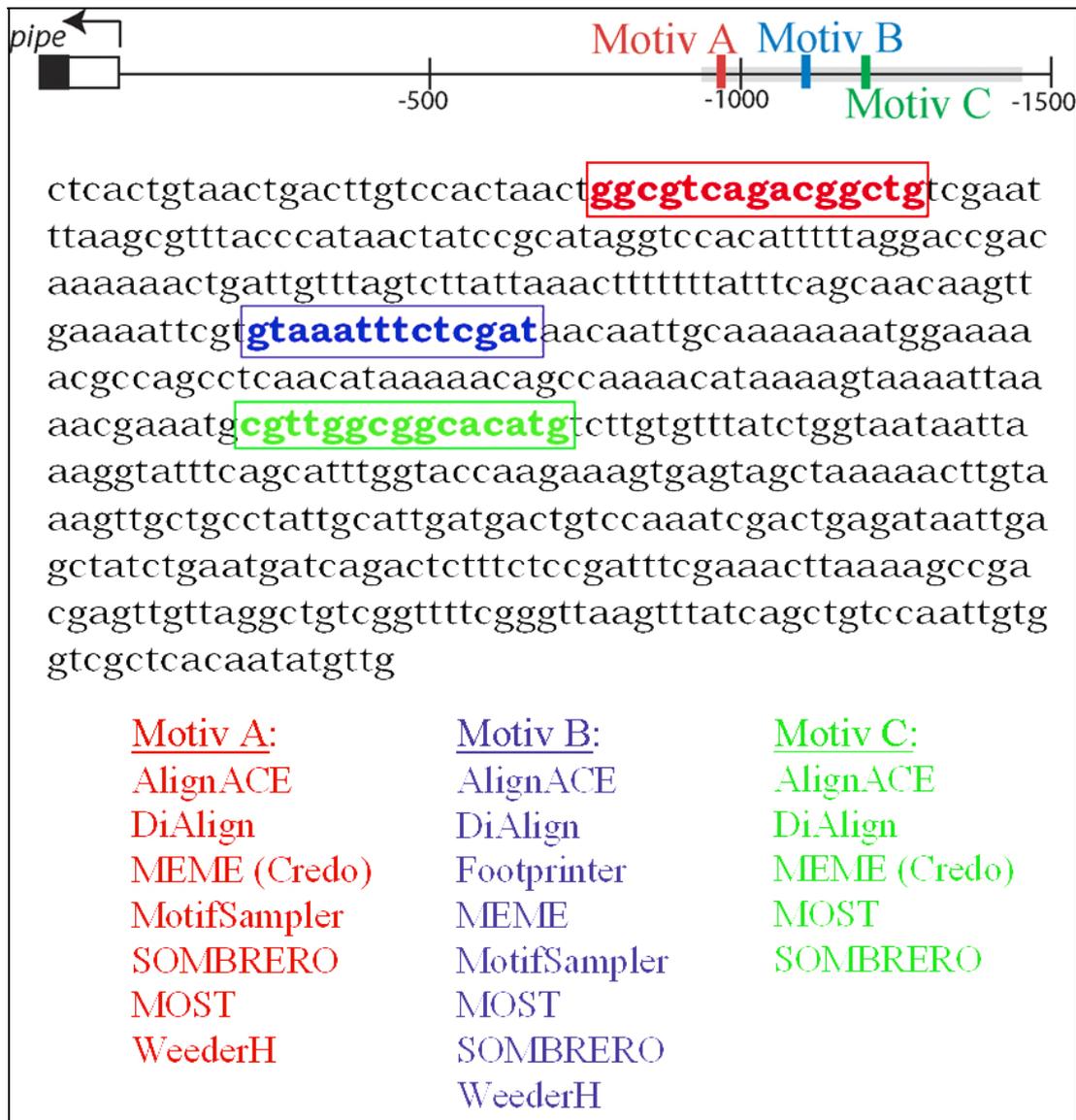


Abbildung 1.2.15.: Von mindestens 5 unterschiedlichen Programmen vorhergesagte Motive innerhalb eines 500bp Abschnitts der *pipe*-upstream-Region. Die Skizze oben in der Abbildung zeigt schematisch die Position der identifizierten Motive A, B und C relativ zum Transkriptionsstart. Gezeigt ist die genomische Orientierung (basaler Promotor links). Der graue Balken markiert den Sequenzbereich, der in den TFBS-Vorhersage-Programmen verwendet wurde. Die Sequenz dieses Bereichs ist darunter angegeben, dabei ist die genaue Lage der Motive in der Sequenz farbig hervorgehoben. Außerdem ist in der Abbildung aufgeführt, welche Motive von welchen Programmen vorhergesagt wurden.

Um die von den unterschiedlichen Programmen ermittelten Motive in übersichtlicher Form miteinander vergleichen zu können, haben wir mit Hilfe des Programms WebLogo (Crooks et al., 2004) die einzelnen Motive als Sequenz-Logos (Schneider and Stephens, 1990) dargestellt (Abb. 1.2.16.). Diese intuitive Form der graphischen Darstellung eines Motivs verdeutlicht die Unterschiede in der Variabilität der Konsensussequenzen. Anhand der Sequenz Logos ist die hohe Variabilität der Konsensussequenzen ersichtlich, die für Motiv A und C gleichzeitig stehen, im Gegensatz zu den jeweils nur ein Motiv einschließenden. Dass eine geringe Anzahl von unterschiedlichen Sequenzen als Grundlage eines Motivs aber auch zu einem geringen Informationsgehalt führt (ersichtlich an der geringeren Höhe der

Buchstaben), zeigen die beiden separaten Sequenzlogos für Motiv A und C, die von MEME bei der Benutzung über Credo erstellt wurden, und die auf der Grundlage von nur je zwei unterschiedlichen Bindestellen erstellt wurden.

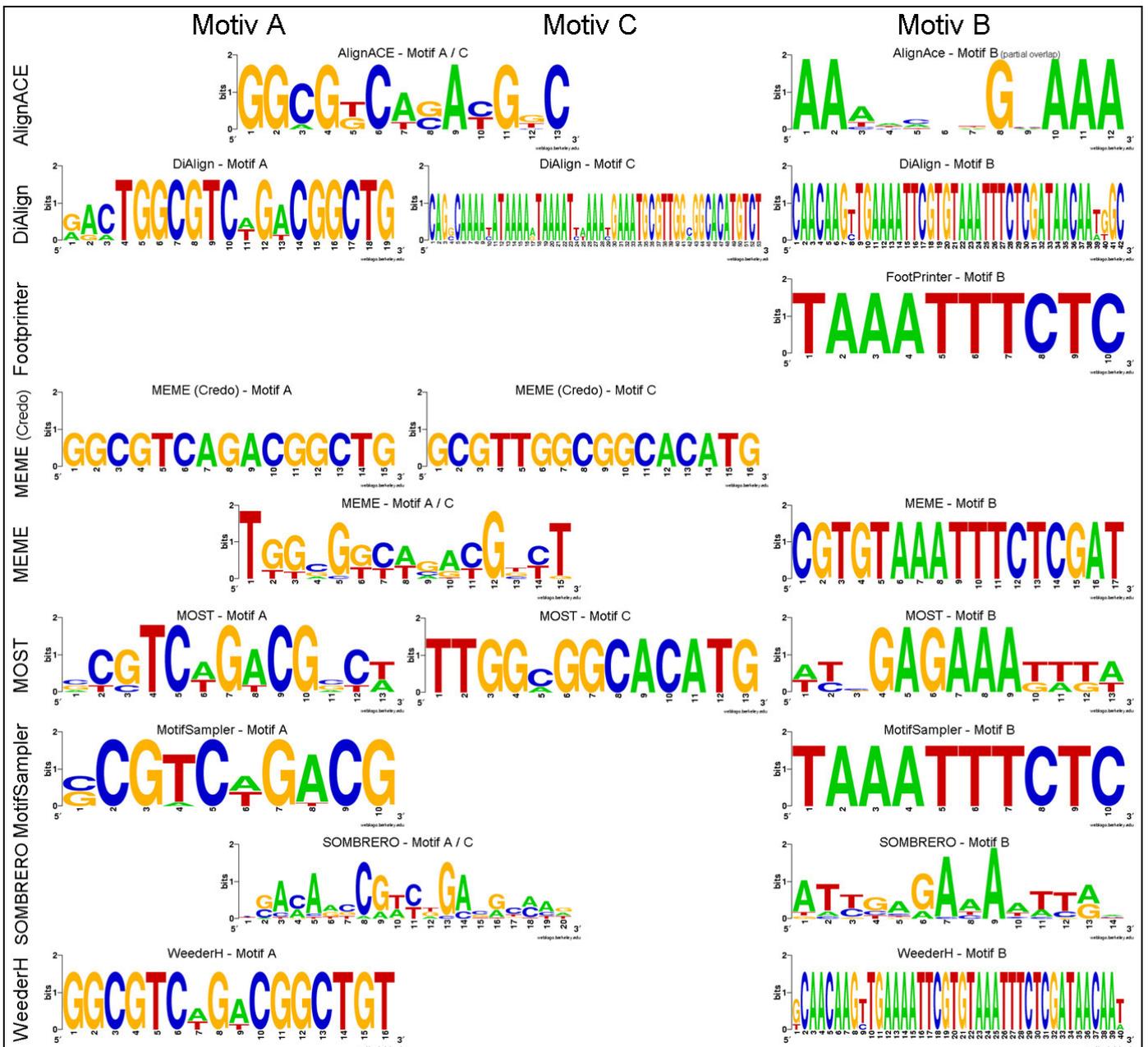


Abbildung 1.2.16.: Sequenz-Logos der von den TFBS-Vorhersage-Programmen ermittelten Versionen der Motive A-C.

Die durch die Variabilität der Konsensussequenz bedingte unterschiedliche Spezifität der Motive kommt auch in der variablen Anzahl der individuellen Bindestellen innerhalb einer Sequenz, die von den einzelnen Programmen für jedes Konsensusmotiv gefunden werden, zum Ausdruck. Die folgende Abbildung (1.2.17., vergleiche auch die Ergebnisse von CREDO, Abb. 1.2.14.) zeigt die konkreten Bindestellen, die von den Programmen MEME (bei direkter Verwendung), MOST, SOMBRERO und WeederH für die Motive A-C in der Sequenz von

D.mel. identifiziert wurden (A – rot, B – blau, C – grün, gemeinsames Motiv A/C – orange). Die Lage der Bindestellen, die mit der Position der Motive A-C der Gesamtauswertung übereinstimmen, sind jeweils entsprechend gekennzeichnet (farbige Rahmen).

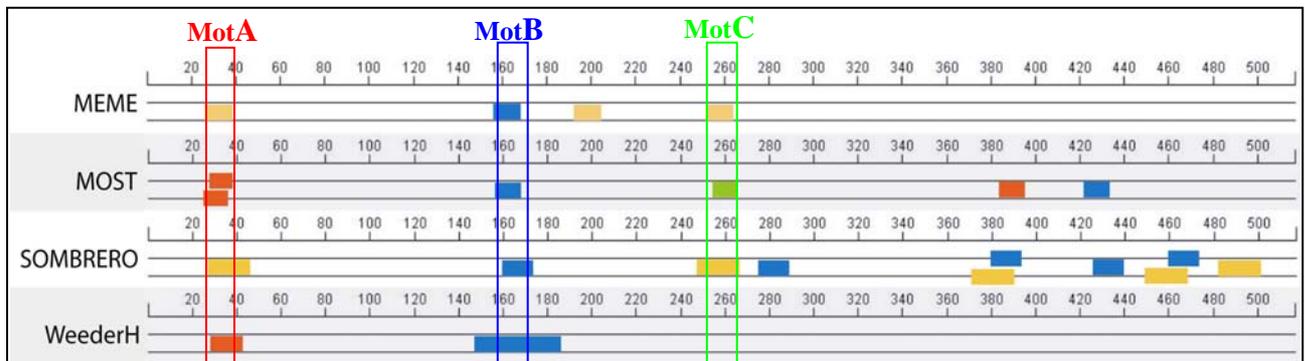


Abbildung 1.2.17.: Die Lage der von den Programmen MEME, MOST, SOMBRERO und WeederH identifizierten Versionen der Motive A, B und C. Die Positionen der individuellen Bindestellen in der Sequenz sind schematisch durch farbige Blöcke markiert: Motiv A – rot, Motiv B – blau, Motiv C – grün, gemeinsames Motiv A/C – orange. Die Position der Bindestellen, die mit den Motiven A-C der Gesamtauswertung übereinstimmen, ist durch farbige Rahmen gekennzeichnet.

Der Vergleich der Sequenz Logos (Abb. 1.2.16.) und der unterschiedlichen Anzahl der Bindestellen pro Konsensusmotiv (Abb. 1.2.14. u. 1.2.17.) zeigt, dass MOST und vor allem AlignACE und SOMBRERO sehr unspezifisch in der Vorhersage sind (hochvariable Konsensussequenzen und mehrere Bindestellen pro Motiv). WeederH und Footprinter zeigen dagegen eine hohe Spezifität, da sie jedes Motiv nur einmal identifizieren. Das Motiv B wird dagegen von MOST zweimal und von SOMBRERO sogar fünfmal gefunden. Auch die Sequenzlogos für Motiv B veranschaulichen die geringe Spezifität von SOMBRERO, MOST und AlignACE, ersichtlich an der variablen Konsensussequenz. Die Sequenzlogos der anderen Programme verdeutlichen dagegen gerade für das Motiv B die hundertprozentige Konservierung dieser Region, da sich diese spezifischeren Programme jeweils auf die einzige hoch konservierte Bindestelle innerhalb der homologen Sequenzen beschränken. Auch die von MOST benutzte Strategie der besonders hohen Konservierung des Kernbereichs eines Motivs, spiegelt sich deutlich in dem Sequenzlogo von Motiv B wider.

Die Unterschiede im Fall von MEME, die bei der Benutzung von der originalen homepage im Vergleich zu der Benutzung mittels CREDO auftreten, demonstrieren jedoch wie sehr die Sensitivität und die Spezifität eines Programms von den verwendeten Parametern abhängt. Bei der Verwendung via CREDO identifiziert MEME die beiden Motive A und C getrennt (Abb. 1.2.14.), während bei der direkten Verwendung von MEME beide Motive unter ein Konsensusmotiv zusammengefasst werden (Abb. 1.2.17.). Die Spezifität von MEME ist daher bei der direkten Verwendung geringer gewesen, als bei der Benutzung via CREDO (vergleiche auch die unterschiedliche Variabilität der Konsensussequenzen, Abb. 1.2.16.). Die Unterschiede zwischen den anderen Programmen kommen vor allem dadurch zustande, dass die Programme bei der Identifizierung der Motive unterschiedliche Motivlängen als optimal ermitteln.

Einen Sonderfall stellt das Programm DiAlign dar, welches nahezu für den gesamten Sequenzbereich Motive vorhersagt und daher hoch sensitiv ist (Abb. 1.2.15.). Dabei zeigen die Motive jedoch aufgrund der Länge trotzdem eine relativ geringe Variabilität (Abb. 1.2.17.). Der Grund dafür ist, dass die Vorhersagen von DiAlign ausschließlich auf der Konservierung beruhen, dieses Programm ist daher für die spezielle Suche nach TFBS eigentlich ungeeignet. Die von DiAlign erhaltenen Resultate sind eher mit denen der weiter oben aufgeführten Alignment-Programme vergleichbar (Kap. 1.2.1).

Bis auf MOST geben alle verwendeten Programme auch eine Abschätzung der statistischen Signifikanz eines identifizierten Motivs an. Dabei korreliert speziell im Falle von WeederH die vom Programm ermittelte Signifikanz eines Motivs mit der von uns ermittelten Signifikanz anhand der übereinstimmenden Identifizierung mehrerer Programme: Motiv B wird von der statistischen Signifikanz am höchsten eingestuft, Motiv A am zweithöchsten. Auch Footprinter ermittelt die höchste Signifikanz für Motiv B, da dieses als einziges Motiv identifiziert wird. Die anderen Programme (MotifSampler, DiAlign, AlignACE und MEME) weisen Motiv A eine höhere statistische Signifikanz zu, als Motiv B. Dabei taucht bei SOMBRERO das Motiv A/C an fünfter Stelle, und das Motiv B erst an Position 22 auf. Die Programme WeederH und Footprinter zeigen in unserem Fall bezüglich der Spezifität und der Ermittlung der statistischen Signifikanz die beste Leistung.

Der Vergleich der einzelnen Programme anhand der unterschiedlichen Anzahl der Bindestellen pro Motiv (Abb. 1.2.15. u. 1.2.17.) verdeutlicht, dass die parallele Verwendung mehrerer Programme, gerade bei der Verwendung unspezifischer Vorhersageprogramme, eine wichtige Möglichkeit bietet, anhand der Konzentration auf übereinstimmende Resultate die Anzahl der ermittelten Motive einzugrenzen.

1.2.3 Einengung des *cis*-regulatorischen Bereichs mittels terminal deletierter Reportergergen-Konstrukte

Um die *cis*-regulatorische Region auf den für die ventrale Expression im Follikelepithel minimal notwendigen Bereich einzuengen, und um außerdem die Relevanz der vorhergesagten *cis*-regulatorischen Motive *in vivo* zu verifizieren, wurde eine Reihe von verkürzten Promotor-Fragmenten in einen *LacZ*-Reportervektor kloniert und das Expressionsmuster des *LacZ*-Reportergergens *in vivo* in den Eikammern transgener Fliegen untersucht.

Ausgangspunkt für diese Promotor-Analyse war das bereits erwähnte und in der klonalen Analyse zur Wiedergabe des *pipe*-Expressionsmusters eingesetzte *8kb-pipe-LacZ*-Konstrukt (Peri et al., 2002; Sen et al., 1998). Dieses ursprüngliche *pipe*-Reporterkonstrukt enthält 8 kb der *cis*-regulatorischen Region von *pipe* vor der Sequenz des Reportergergens β -Galactosidase. Abbildung 1.2.18. zeigt die genaue Lage des in dem Reporterkonstrukt verwendeten Sequenzabschnitts bezüglich des *pipe*-Locus. Die 8 kb Sequenz umfasst ca. 3 kb der *cis*-regulatorischen Region upstream von *pipe*, sowie ein kurzes Stück (288 bp) der

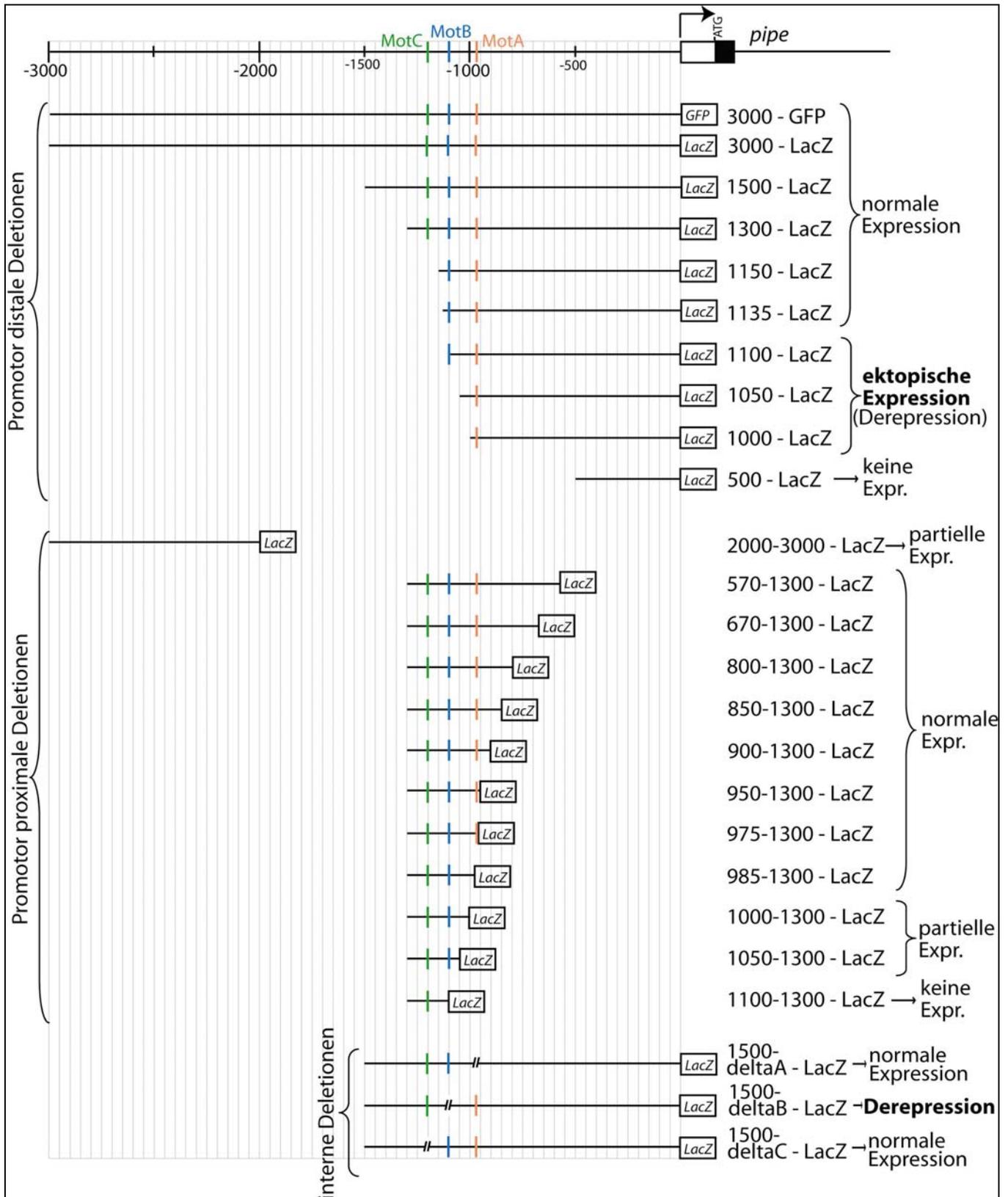


Abbildung 1.2.19.: Übersicht über die analysierten *pipe*-Promotor-Konstrukte. Ganz oben ist die Region um den Transkriptionsstart des *pipe*-Gens skizziert (von -3000 bis +1000), umgekehrt zur genomischen Orientierung. Darunter sind die klonierten Reporterstrukturen gezeigt. Die schwarze Linie markiert das Promotor-Fragment, das jeweils vor das *LacZ*-Reportergen kloniert ist (im Falle des 3000bp Fragmentes ist zusätzlich ein GFP Konstrukt kloniert worden). Die Lage der mittels TFBS-Vorhersage-Programmen identifizierte Motive A-C (siehe Kapitel 1.2.2.3-4, Abb. 1.2.15.-1.2.16.) ist farbig markiert. Rechts ist das resultierende Expressionsmuster angegeben.

Abbildung 1.2.20. zeigt zunächst die Ergebnisse für die Promotor-distalen Deletionen. Das Minimalfragment, das eine komplette, *pipe*-identische Expression des Reportergens bewirkt (in Abbildung 1.2.19. und im Folgenden auch als wildtypische Expression bezeichnet) ist ungefähr 1150 bp (vom Transkriptionsstart upstream) groß.

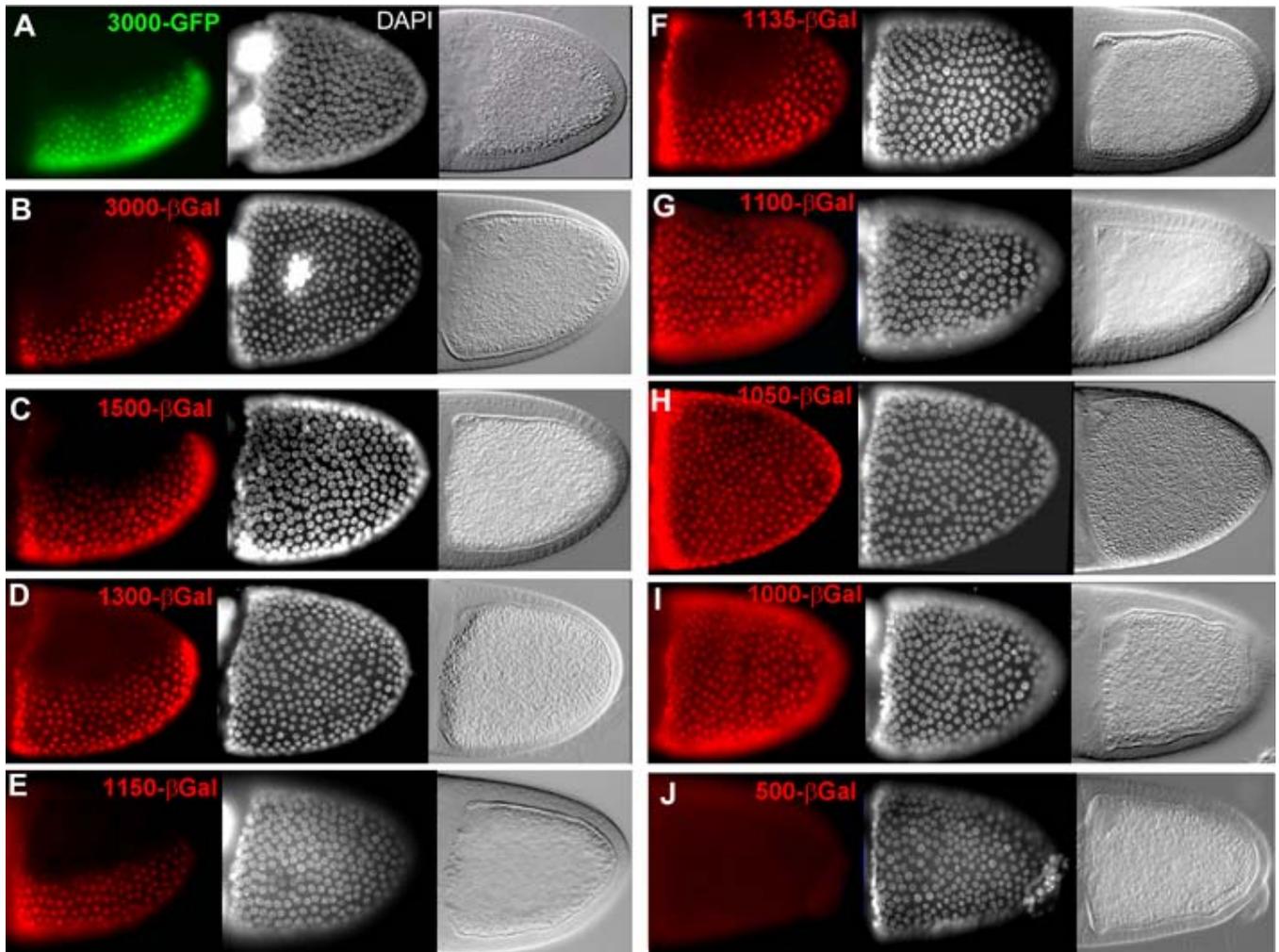


Abbildung 1.2.20.: Expressionsmuster der distal deletierten *pipe*-Promotor-Konstrukte. Stadium 10 Eikammern, Lateralansicht. Die erste Reihe zeigt jeweils das durch anti-GFP (A), bzw. anti-βGal (B-J) Antikörperfärbungen sichtbar gemachte Expressionsmuster des Reportergens. Die zweite Spalte zeigt anhand einer DAPI-Färbung die Unversehrtheit des gesamten Follikelepithels. Die dritte Spalte demonstriert anhand von Normarski-Aufnahmen, in denen der dorsal lokalisierte Zellkern sichtbar ist, dass es sich um Lateralansichten handelt. Die Expressionsmuster werden im Text und in der Abbildung 1.2.22. erläutert.

Besonders interessant sind die nächst kleineren Konstrukte, die bei Größen zwischen 1100 bp und 1000 bp (Abb. 1.2.20. G-I), zu einer uniformen Expression des Reportergens im gesamten Follikelepithel führen. Diese ektopische Expression auf der dorsalen Seite der Eikammer deutet darauf hin, dass in diesen Konstrukten insbesondere Repressor-Bindestellen deletiert sind, die für die EGFR-vermittelte Inhibition der Expression verantwortlich sind. Im Folgenden werde ich diese Form der Expression eines Reportergens auch als Derepression bezeichnen. Das Konstrukt 1100-*LacZ* ist das größte Konstrukt, das bereits eine deutliche Derepression zeigt. In diesem Fragment ist das Motiv B gerade noch

enthalten (Abb. 1.2.19). Durch den Vergleich der Konstrukte 1135-*LacZ* (wildtypische Expression) und 1100-*LacZ* (Derepression) lässt sich der Repressor-bindende Bereich auf 35 bp eingrenzen. Die wildtypische Expression der Konstrukte 1150-*LacZ* und 1135-*LacZ* (Abb. 1.2.20. E, F) zeigt außerdem, dass das Motif C keine essentielle Funktion hat, da der entsprechende Bereich in diesen Konstrukten deletiert ist (Abb. 1.2.19).

Die nächste Abbildung (1.2.21.) führt diejenigen Promotorkonstrukte auf, bei denen auch von der Promotor-proximalen Seite aus Deletionen vorgenommen wurden. Die Expressionsmuster dieser Reporterstrukturen zeigen, dass ein relativ großer *cis*-regulatorischer Bereich direkt upstream des Transkriptionsstartes nicht essentiell ist. Das Fehlen des basalen Promotors in diesen Konstrukten ist nicht relevant, da die Promotorfragmente in dem Reportervektor jeweils vor einen *hsp70*-Minimalpromotor kloniert sind. Bis zu 985 bp der direkten upstream Sequenz können deletiert sein, ohne dass das Expressionsmuster des Reportergens merklich verändert wird (Abb. 1.2.21. B-I). Da in dem wildtypisch exprimierten 985-1300-*LacZ* Konstrukt auch das Motiv A zu einem Großteil deletiert ist (5 Basen bleiben erhalten) (Abb. 1.2.19.), hat auch dieses Motiv höchstwahrscheinlich keine essentielle Funktion. Vergrößert man den deletierten proximalen Bereich weiter, so verändert sich das Expressionsmuster allerdings deutlich. Bei einer Deletion von 1000 bp kommt es zunächst zu einer Abschwächung der Expressionstärke, wobei die Expression am posterioren Ende der Eikammer in voller Stärke erhalten bleibt (Abb. 1.2.21. J). Eine Deletion um weitere 50 bp verstärkt diesen Effekt noch, so dass fast ausschließlich die posteriore Expressionsdomäne zu erkennen ist (Abb. 1.2.21. K). Eine Verkürzung um insgesamt 1100 bp führt schließlich zum völligen Ausbleiben der Expression (Abb. 1.2.21. L). Bei allen untersuchten proximalen Deletionen beschränkt sich die Expression auf die ventrale Seite der Eikammer, der repressorische Einfluss des EGFR-Signalwegs auf der dorsalen Seite bleibt also erhalten. In diesem Bereich der *cis*-regulatorischen Region liegen demnach vorwiegend Bindestellen für notwendige Transkriptions-Aktivatoren. Interessanterweise führt auch ein weiter upstream gelegenes Enhancer-Fragment (2000-3000, Abb. 1.2.19. u. 1.2.21. A) zu einem ähnlichen Expressionsmuster wie im Falle der 1000-1300, bzw. 1050-1300 Fragmente, nämlich zu der beschriebenen posterioren Teilexpression. Dieser Sequenz-Abschnitt ist upstream des distal deletierten Minimalfragmentes lokalisiert, dass eine wildtypische Expression zeigt (Abb. 1.2.19.). Das entsprechende Expressionsmuster deutet somit auf redundante Aktivator-Bindestellen hin.

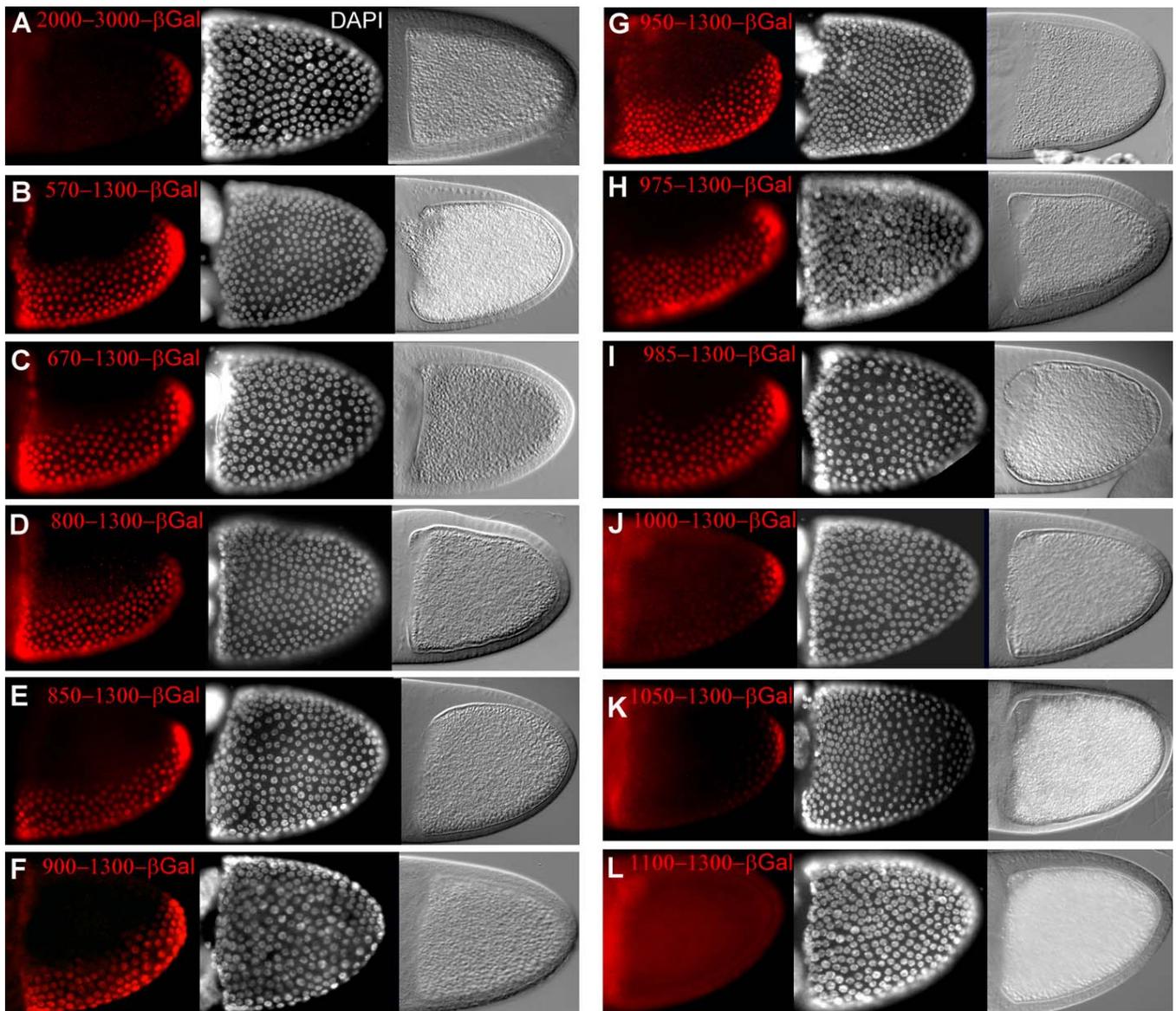


Abbildung 1.2.21.: Expressionsmuster der proximal deletierten *pipe*-Promotor-Konstrukte. Stadium 10 Eikammern, Lateralansicht. Die erste Spalte zeigt jeweils das durch anti- β Gal Antikörperfärbungen sichtbar gemachte Expressionsmuster des Reportergens. Die zweite Spalte zeigt anhand einer DAPI-Färbung die Unversehrtheit des gesamten Follikel epithels. Die dritte Spalte demonstriert anhand von Normarski-Aufnahmen, in denen der dorsal lokalisierte Zellkern sichtbar ist, dass es sich um Lateralansichten handelt. Die Expressionsmuster werden im Text und in der Abbildung 1.2.22. erläutert.

1.2.4 Test vorhergesagter TFBS durch intern deletierte/mutierte Reporter-Konstrukte

Um die Relevanz der vorhergesagten *cis*-regulatorischen Motive A-C gezielter zu untersuchen, wurden zunächst intern deletierte Reporterkonstrukte hergestellt. Die in diesen Konstrukten verwendete *cis*-regulatorische Region umfasste die gesamte Sequenz von 1,5 kb upstream des *pipe*-Promotors, wobei jeweils intern ein Sequenzabschnitt von ca. 20 bp deletiert war. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Deletionskonstrukte getestet, in denen jeweils eines der drei ermittelten Motive deletiert war (siehe schematische Darstellung der Konstrukte unter „interne Deletionen“ in Abb. 1.2.19.). Wie oben beschrieben, kann

allerdings ein Effekt für die Deletionen der Bindestellen A und C mittlerweile auch schon anhand der Ergebnisse der terminalen Deletionskonstrukte weitgehend ausgeschlossen werden. In der Tat führte auch, wie die Abbildung 1.2.22 (A und C) zeigt, die interne Deletion dieser Motive zu keiner Veränderung des wildtypischen *pipe*-Musters. Das Konstrukt *1500-ΔB-LacZ* wird dagegen uniform im gesamten Follikelepithel exprimiert (Abb. 1.2.22. B).

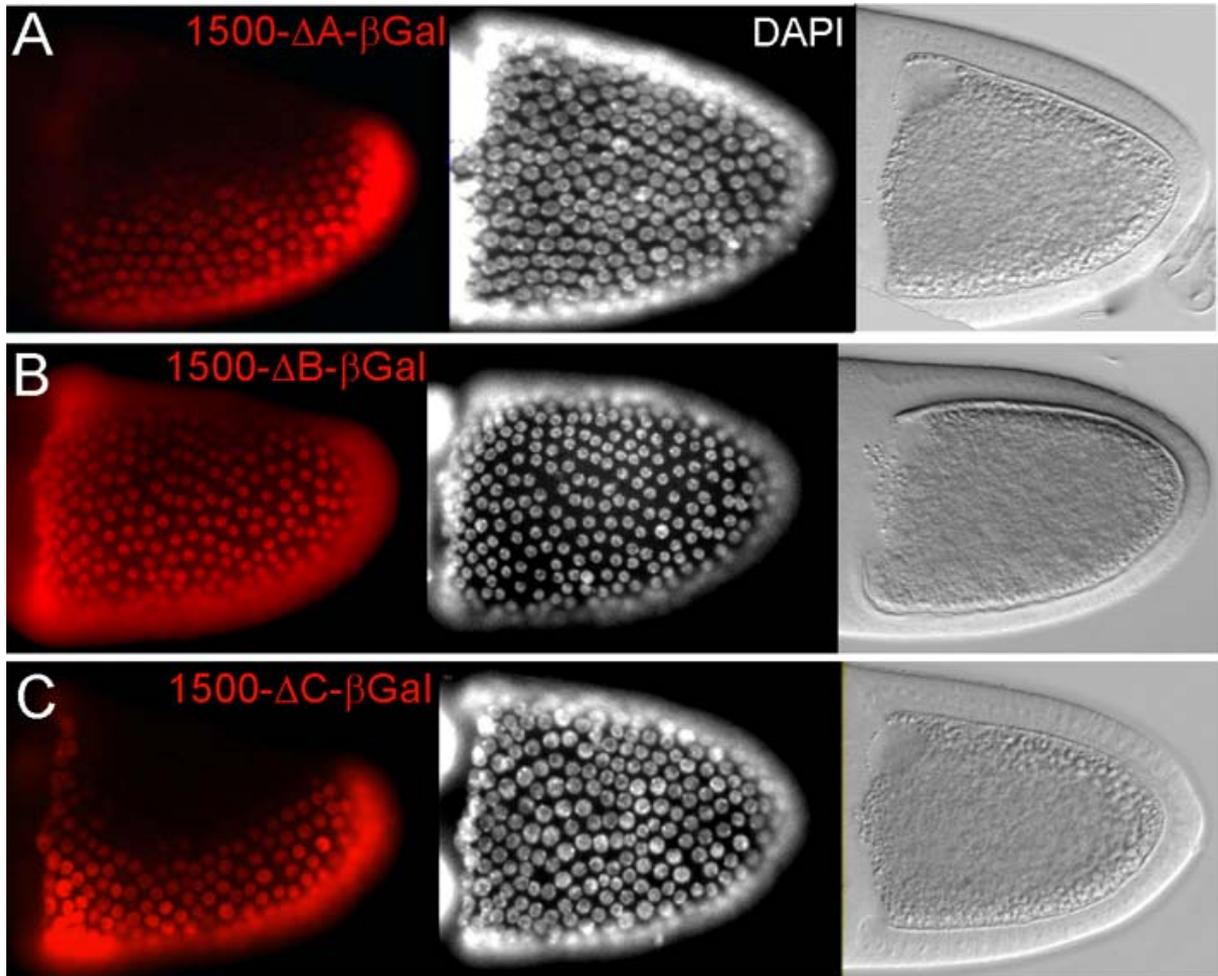


Abbildung 1.2.22.: Expressionsmuster der intern deletierten *pipe*-Promotor-Konstrukte. Stadium 10 Eikammern, Lateralansicht. Die erste Spalte zeigt jeweils das durch anti-βGal Antikörperfärbungen sichtbar gemachte Expressionsmuster des Reportergens. Die zweite Spalte zeigt anhand einer DAPI-Färbung die Unversehrtheit des gesamten Follikelepithels. Die dritte Spalte demonstriert anhand von Normarski-Aufnahmen, in denen der dorsal lokalisierte Zellkern sichtbar ist, dass es sich um Lateralansichten handelt. Die Konstrukte enthalten jeweils 1500bp der *pipe*-upstream-Region, wobei in jedem Konstrukt eines der mittels TFBS-Vorhersage-Programmen identifizierten Motive A-C (s. Kapitel 1.2.2.3-4., Abb. 1.2.15.-1.2.16.) deletiert ist. Nur die Deletion des Motivs B führt zu einer deutlichen Derepression, bzw. zur uniformen Expression des Reportergens (siehe auch Abb. 1.2.19.).

Die deutliche Derepression als Folge der Deletion des Motivs B, ist ein wichtiger Hinweis auf die Relevanz dieses *cis*-regulatorischen Bereichs. Der Nachteil einer internen Deletion ist allerdings, dass sich auch die räumliche Anordnung nebeneinander liegender Bindestellen außerhalb des deletierten Abschnitts verändert. Dadurch wird unter Umständen eine notwendige Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinträchtigt, so dass der

beobachtete Effekt auch durch einen Einfluss auf upstream oder downstream von Motiv B bindende Faktoren hervorgerufen werden könnte.

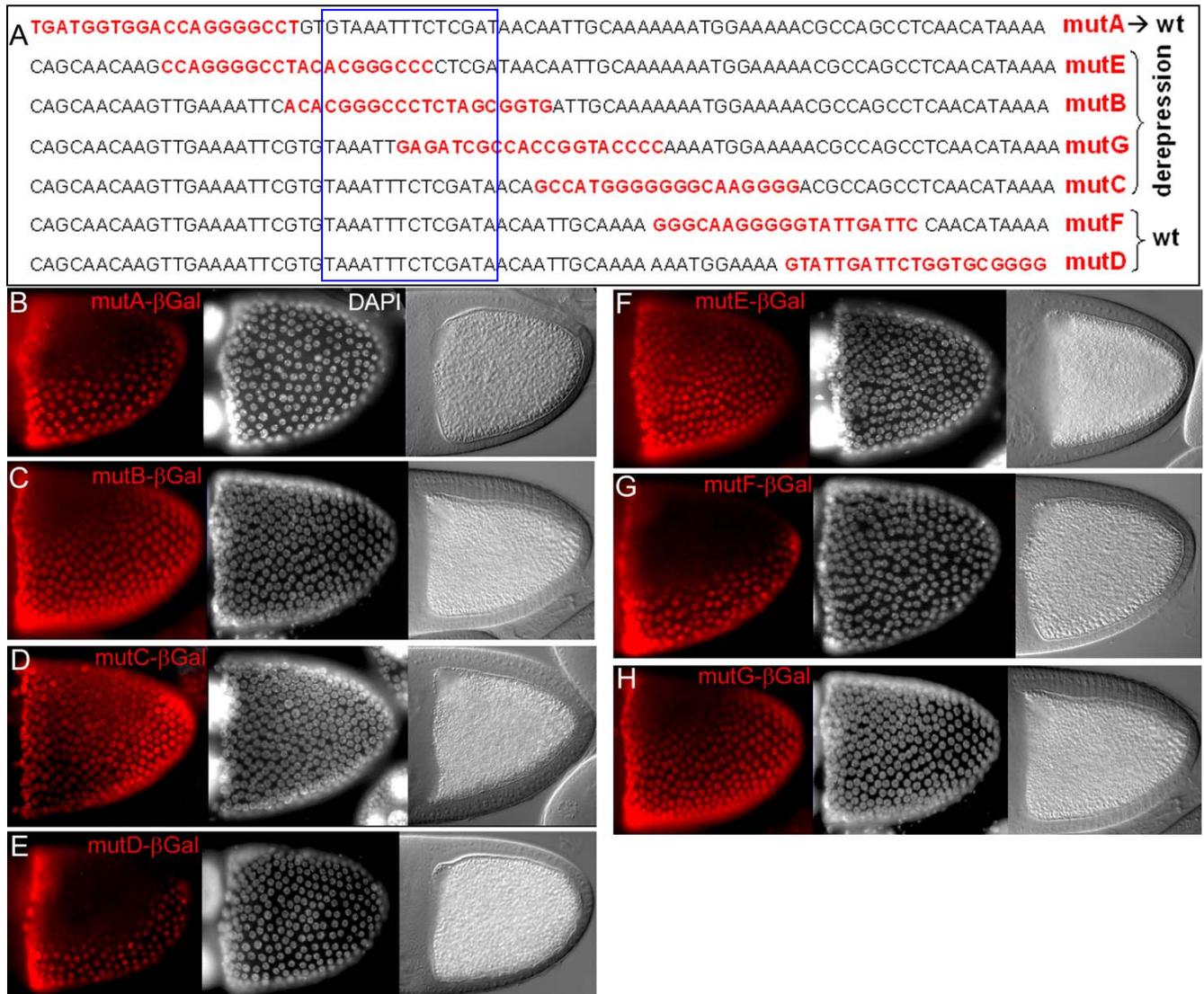


Abbildung 1.2.23.: Expressionsmuster der intern mutierten *pipe*-Promotor-Konstrukte. (A) Ausschnitt aus der Sequenz der Reporterkonstrukte. In rot ist jeweils der Abschnitt markiert, der in den Konstrukten verändert ist. Der blaue Rahmen markiert das vorhergesagte Motiv B. Rechts ist das beobachtete Expressionsmuster angegeben. (B-H) Stadium 10 Eikammern, Lateralansicht. Die erste Spalte zeigt das durch anti-βGal Antikörperfärbungen sichtbar gemachte Expressionsmuster des Reportergens. Die zweite Spalte zeigt anhand einer DAPI-Färbung die Unversehrtheit des gesamten Follikelepithels. Die dritte Spalte demonstriert anhand von Normarski-Aufnahmen, in denen der dorsal lokalisierte Zellkern sichtbar ist, dass es sich um Lateralansichten handelt.

Um die Relevanz der ermittelten Repressorbindestelle zu verifizieren, wurde daher auch eine Reihe intern veränderter („mutierter“) Reporterkonstrukte getestet. Dazu wurden für den gesamten zum damaligen Zeitpunkt in Frage kommenden Bereich jeweils 20 Basenpaare ausgetauscht, wobei insgesamt sieben verschiedene Konstrukte getestet wurden, bei denen der mutierte Bereich jeweils um 10 Basenpaare überlappte (siehe Schema in Abb. 1.2.23. A). Diese Technik der schrittweisen Veränderung nebeneinander liegender kurzer Sequenzabschnitte wird auch als „linker scanning“ bezeichnet (McKnight and Kingsbury,

1982). Der Austausch der Sequenz erfolgte in der Form, dass jede Base gegen eine nicht komplementäre Base ausgetauscht wurde.

Die Abbildung 1.2.23. (B-H) zeigt die Ergebnisse für die intern veränderten Reporter-Konstrukte. Die Konstrukte bestätigen zwar die Bedeutung des vorhergesagten Binde-Motivs B, allerdings wird deutlich, dass insgesamt ein etwas größerer Sequenzabschnitt eine Rolle bei der Bindung von reprimierenden Faktoren spielt. Insbesondere bewirkt das Konstrukt mutC, bei dem das eigentliche Motiv B nicht verändert ist, ebenfalls eine ektopische Expression auf der dorsalen Seite. Ganz dorsal ist die ektopische Expression der Konstrukte teilweise etwas schwächer ausgeprägt (mutB und mutG), dabei liegt der Bereich der schwächeren Derepression nicht direkt über dem Oocytenkern, sondern etwas weiter posterior. Insgesamt zeigen die Konstrukte mutB, mutC, mutE und mutG eine deutliche Derepression, während die Konstrukte mutA, mutD und mutF im normalen *pipe*-Muster exprimiert werden. Durch den Vergleich der überlappenden, in den jeweiligen Konstrukten mutierten Sequenzen, lässt sich der Bereich, der für die dorsale Repression von *pipe* benötigt wird, weiter eingrenzen.

1.2.5 Auswertung der Bioinformatik-Analyse und der Reportergen-Konstrukte: Identifizierung einer Repressorbindestelle

Die Abbildung 1.2.24. fasst die Ergebnisse der untersuchten Promotor-Deletions-Konstrukte und insbesondere des, auf der Grundlage des vorhergesagten *cis*-regulatorischen Motivs B durchgeführten, linker-scannings zusammen. Gezeigt ist ein kurzer Abschnitt des von uns analysierten *pipe*-Enhancers in der Umgebung des vorhergesagten Motivs B.

Oben in der Abbildung ist eine schematische Darstellung der *pipe*-upstream-Region gezeigt, in der die Lage des Motivs B blau markiert ist. (Angegeben ist die genomische Orientierung, so dass der basale Promotor links lokalisiert ist.) Darunter sind schematisch die drei relevanten Reporterkonstrukt-Fragmente dargestellt. Das 1500-deltaB-*LacZ*-Konstrukt, in dem das Motiv B intern deletiert ist, zeigt eine deutliche Derepression des Reportergens (Abb. 1.2.22. B). Das größte distal deletierte Konstrukt, das eine Derepression zeigt, enthält 1100 bp der upstream Sequenz (Abb. 1.2.19. u. 1.2.20.G). Das 35 bp größere Konstrukt 1135-*LacZ* wird wildtypisch exprimiert. Eine weitere Einschränkung der Repressor-Bindestellen-Region durch Promotor-proximal deletierte Reporterstrukture war nicht möglich, da in proximal deletierten Fragmenten, in denen die relevante Region enthalten ist, bereits essentielle Aktivator-Bindestellen betroffen sind (Abb. 1.2.19. u. 1.2.21.K, L). Die stärkste Eingrenzung des relevanten Bereichs ermöglichte der Vergleich der intern mutierten Reporterstrukture (wildtypische Expression der Konstrukte mutA, mutD und mutF, Derepression im Falle von mutB, mutC, mutE und mutG, s. Abb. 1.2.23.). Die dadurch ermittelte Region ist grau markiert. Die Sequenz dieses Bereichs ist im unteren Teil der Abbildung 1.2.24 angegeben, das Motiv B ist auch hier blau hervorgehoben.

Die relevante Region ließ sich insgesamt auf ein 31 bp Minimal-Fragment eingrenzen (31 bp Repressor-Bindestellen-Region, s. Abb. 1.2.24), in welchem sich auch das von den meisten TFBS-Vorhersage-Programmen identifizierte Motiv B befindet. In diesem Sequenzabschnitt sollten auf jeden Fall alle essentiellen Repressor-Bindestellen enthalten sein.

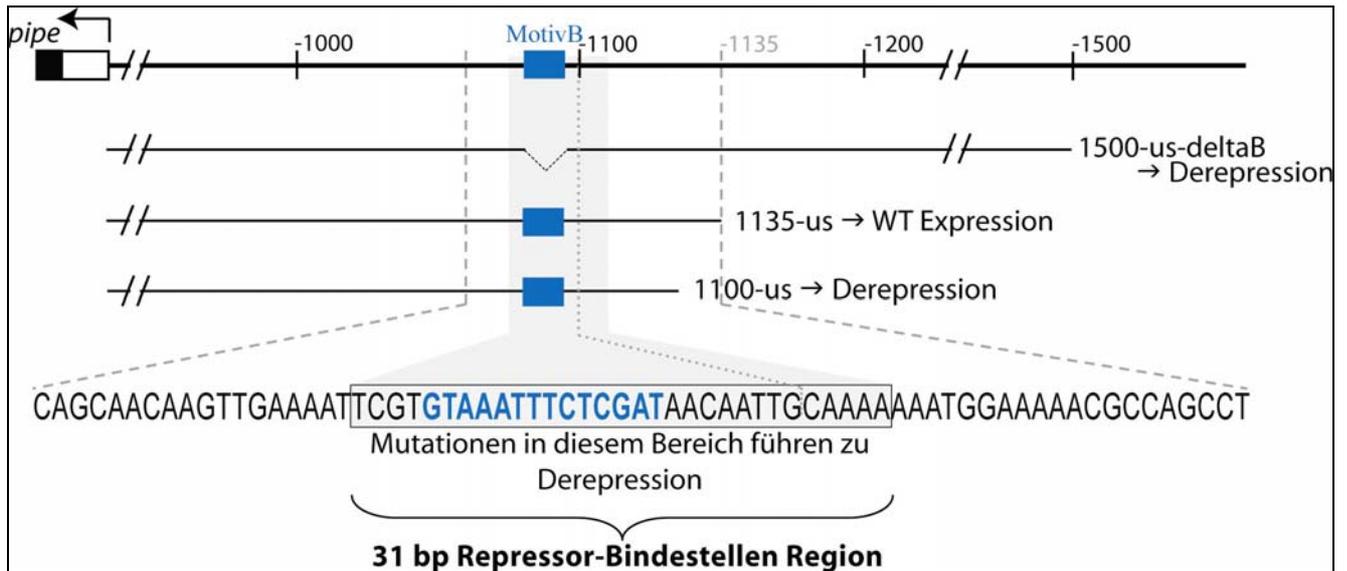


Abbildung 1.2.24.: Identifizierung einer 31 bp Repressor-Bindestellen-Region durch Auswertung der *pipe*-Promotor-Analyse. Die Skizze oben zeigt die *pipe*-upstream-Region, in der genomischen Orientierung, nur der zentrale Bereich ist maßstabsgetreu dargestellt. Die Lage des Motivs B ist blau markiert. Darunter sind schematisch die entscheidenden Reporterkonstrukt-Fragmente skizziert, dabei ist auch das jeweils beobachtete Expressionsmuster angegeben. Unten ist die Sequenz der direkten Umgebung des Motivs B (blau) gezeigt. Der graue Kasten markiert den Bereich, der im Falle einer veränderten Sequenz („Mutation“) in Reporterkonstrukten zu einer Derepression des Reportergens führt.

1.2.6 Experimente zur Isolierung von an das identifizierte *cis*-regulatorische Motiv bindenden Transkriptionsfaktoren

1.2.6.1 Yeast One-Hybrid screen

Um Proteine zu identifizieren, die spezifisch an die identifizierte Repressor-Bindestelle des *pipe*-Enhancers binden, wurde ein Yeast-One-Hybrid-Screen durchgeführt (Wang and Reed, 1993). Dazu wurde das *Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit* verwendet (Clontech). Die Yeast-One-Hybrid-Methode beruht darauf, dass potentielle DNA-bindende Proteine (die „Beute“) fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne in Hefezellen transformiert werden, und dort durch die Bindung an eine spezifische Zielsequenz (den „Köder“) die Expression eines Reportergens (HIS3) induzieren, welche es dem verwendeten Hefestamm (Y187) erlaubt auf Minimalmedium (ohne Histidin) zu wachsen.

Zunächst wurde eine Ovarien-spezifische cDNA-Bibliothek hergestellt. Die Bildung der cDNA-Gal4-Fusionen erfolgte mittels homologer Rekombination in den pGADT7-Rec2 Vektor innerhalb entsprechend transformierter Hefezellen (Material und Methoden).

In den pHIS2.1 Köder-Vektor wurden als Zielsequenz drei Tandem-Wiederholungen der ermittelten 31bp Repressorbindestelle (s. Abb. 1.2.24) kloniert (*3pipe-rep-pHIS2.1*).

Mit Hilfe einer Reihe von Testtransformationen wurde ermittelt, dass eine 75 mM Konzentration des Inhibitors 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) die Hintergrund-Expression des HIS3 Reportergens als Folge unspezifischer Wechselwirkungen vollständig unterbindet.

Für den eigentlichen screen wurden daher die Hefezellen nach der Cotransformation mit der cDNA Bibliothek, dem pGADT7-Rec2 (enthält LEU2) Vektor und dem *3pipe-rep-pHIS2.1* Vektor (enthält TRP1) auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und mit 75 mM 3-AT ausplattiert.

Bei einer Transformationseffizienz von $2,1 \cdot 10^5$ sind nach 7 Tagen

329 Kolonien gewachsen.

Davon wuchsen

289 Kolonien nach erneutem Ausstreichen zur Verifizierung auf Platten mit einer **3-AT** Konzentration von bis zu **100 mM**.

Von diesen konnten wir wiederum

271 Kolonien nach Isolierung mittels Kolonie-PCR erfolgreich **sequenzieren**.

Die Sequenzen wurden gegen das Genom von *Drosophila melanogaster* geblastet und die identifizierten Gene auf die annotierten Funktionen hin untersucht. Dabei wurden in den Fällen, in denen keine experimentellen Daten zugrunde lagen, die unter flybase verfügbaren Vorhersagen verschiedener Programme zur Funktion und zu vorhandenen Protein-Domänen für die Klassifizierung berücksichtigt.

Die ermittelten Sequenzen zeigten einen enorm hohen Hintergrund von offensichtlichen falsch positiven Klonen (false positives). Als offensichtliche false positives bezeichne ich hierbei alle Proteine, für die keine direkte Bindung an DNA zu erwarten ist. Die Tabelle 2.1

listet alle ermittelten Sequenzen, gruppiert zu funktional ähnlichen Proteinen, auf. Dabei ist zu beachten, dass viele Sequenzen mehrfach auftauchten (bis zu 8-mal). Zu den besonders häufig gefundenen false positives gehören vor allem Haushaltsenzyme (z.B. Glycolyse Enzyme), ribosomale Proteine und Komponenten der Eihülle (Chorion- und Vitellinmembranproteine). Dabei handelt es sich jeweils um besonders stark transkribierte Gene, die in cDNA Bibliotheken in besonders großer Menge vorhanden sind und die häufig zu falsch positiven Resultaten in Hefe Screens führen ((Wen et al., 2000a); persönliche Kommunikation Stephan Wenkel).

Enzyme (vorwiegend klassische Haushaltsenzyme):	62	
Ribosomale Proteine:	40	
Komponenten der Eihülle (Chorion-, Vitellinmembranproteine):	23	
RNA-bindende Proteine:	17	
DNA-bindende Proteine:	32	
- Histone:		4
- Transkriptionsfaktoren:		13
- sonstige DNA bindende Proteine (z.B. ssDNA bindende Proteine)		15
Sonstige annotierte Gene:	51	
Gene ohne annotierte Funktion:	46	
<u>Sequenzierte Kolonien insgesamt:</u>	<u>271</u>	

Tabelle 2.1.: Ergebnisse der Sequenzierung der Yeast-One-Hybrid-Kolonien. Bei den aufgeführten Zahlen ist zu beachten, dass einige Sequenzen mehrfach auftraten (identische Sequenz in unterschiedlichen Kolonien). Dadurch sind in der Tabelle beispielsweise 13 Sequenzen für Transkriptionsfaktoren (TF) aufgeführt, obwohl insgesamt nur 10 verschiedene TF identifiziert wurden. Ein weiterer TF wurde außerdem als Folge einer Blast-Suche unter den Genen ohne annotierte Funktion identifiziert (siehe Text).

Nur 32 (~12%) der Sequenzen gehören zu DNA bindenden Proteinen, wobei in diesem Fall allerdings mehrfach auftretende (maximal doppelt), identische Sequenzen seltener sind. Davon konnten wir 10 als potentielle Transkriptionsfaktoren identifizieren, von denen wiederum 3 doppelt gefunden wurden (Tabelle 2.2.). Die in der Tabelle 2.1. aufgeführten Gene ohne annotierte Funktion, haben wir noch einmal genauer analysiert und insbesondere über eine Blast-Suche mit der jeweiligen Sequenz die Funktion homologer Gene in anderen Organismen überprüft. Dabei wurde ein weiteres Gen identifiziert (CG6770), welches in insgesamt sechs Kolonien auftauchte und welches eine relativ hohe Homologie (68% Identität, 82% Ähnlichkeit) zu dem Transkriptionsfaktor p8 aus *Artemia franciscana* hat. Dieses Protein kommt auch in Mäusen vor und ist dort als ein ungewöhnlicher HMG-Box Transkriptionsfaktor identifiziert worden, der eine Rolle als Effektor von ras-Signalwegen

spielt (Vasseur et al., 2002). Dieses Gen wurde daher in die weitere Analyse der Kandidaten-Transkriptionsfaktoren mit einbezogen.

Gen	mehrfach gefunden	Anzahl verfügbarer ESTs	verwendetes EST	Expressionsmuster	EMSA	Anzahl getesteter RNAi-Linien	RNAi-Effekt
<i>apt</i>		71	LD45581	nur Nährzellen	kein Shift	1	kein Effekt
<i>CG11876</i>		120	GH08474	nur Nährzellen	kein Shift	keine	/
<i>CG12942</i>		6	LD46263	nur Nährzellen	kein Shift	2	kein Effekt
<i>CG4936</i>		19	LD08906	nicht getestet	kein Shift	2	kein Effekt
<i>CG6770</i>	6X	112	selbst kloniert in TOPO	nur Nährzellen	kein Shift	2	kein Effekt
<i>CG8273</i>		6	GM01981	nur Nährzellen	kein Shift	2	kein Effekt
<i>E(bx)</i>	2X	47	RE57757	nur Nährzellen	kein Shift	1	kein Effekt
<i>lolal</i>		88	LD14504	schwache uniforme Expr.	kein Shift	3	kein Effekt
<i>mbf1</i>	2X	83	GH10148	nur Nährzellen	kein Shift	2	kein Effekt
<i>NFAT</i>		69	LD10950	schwache uniforme Expr.	kein Shift	1	kein Effekt
<i>Ssdp</i>	2X	40	GM14473	nur Nährzellen	kein Shift	2	kein Effekt

Tabelle 2.2.: Im Yeast One-Hybrid screen identifizierte Transkriptionsfaktoren.

Die Tabelle 2.2. zeigt eine Liste aller gefundenen Transkriptionsfaktoren, wobei aufgeführt ist, welche davon mehrfach auftauchten. Obwohl aufgrund des offensichtlich sehr hohen Hintergrundes von false positives die Relevanz der ermittelten Faktoren zweifelhaft war, haben wir einige weitere Tests zur Verifizierung der Kandidaten durchgeführt. Die weiteren in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf diese Experimente und werden im folgenden Abschnitt erläutert.

1.2.6.2 Analyse der im Yeast One-Hybrid screen identifizierten Kandidatengene

Analyse der Expressionsmuster mittels *in-situ*-Hybridisierung

Um zu untersuchen, ob für die Kandidaten eine Expression innerhalb des Follikel epithels nachgewiesen werden kann, haben wir zunächst anhand von ESTs (aus der *Drosophila Gene Collection* des *Berkeley Drosophila Genome Project*, BDGP DGC clones, <http://www.fruitfly.org/DGC/index.html>) antisense Proben für diese Gene hergestellt und *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Für *CG4936* haben wir bisher keine *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt, da sich mit den bisher verwendeten ESTs keine Probe

synthetisieren ließ. Für CG6770 haben wir mittels TOPO®-Cloning (Invitrogen) eine eigene cDNA hergestellt. Bei der Auswahl geeigneter ESTs fiel auf, dass für die meisten Kandidaten eine sehr hohe Anzahl verschiedener ESTs zur Verfügung steht (siehe Tabelle 2.2., Ausnahmen bilden nur CG8273 und CG12942), was darauf hindeutet, dass diese Transkriptionsfaktoren besonders stark exprimiert werden. Wie bereits erwähnt, ist eine hohe Expressionsrate oft der Grund für falsch positive Kandidaten, so dass die hohe Anzahl an ESTs die Relevanz der Kandidaten zusätzlich in Frage stellte.

Wir haben für keinen der getesteten Kandidaten eine deutliche oder spezifische Expression im Follikelepithel beobachten können. Die Abbildung 1.2.25. zeigt zwei Beispiele für die typischen gefundenen Expressionsmuster. In den meisten Fällen war ausschließlich eine starke Expression in den Nährzellen erkennbar (siehe als Beispiel CG8273, Abb. 1.2.25. A). In zwei Fällen (*lolal* und *NFAT*) tauchte nach langer Reaktionszeit auch eine schwache uniforme Expression in den Follikelzellen auf (siehe *NFAT*, Abb. 1.2.25. B), wobei diese Färbung nur ganz schwach über der Hintergrund-Färbung lag.

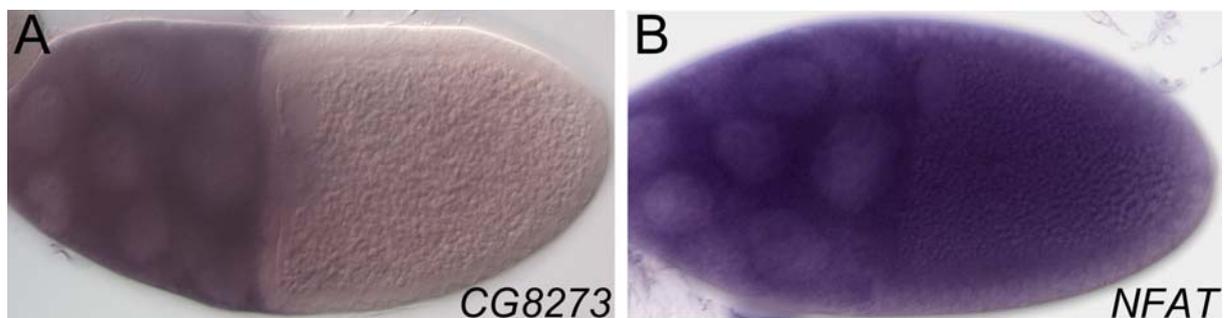


Abbildung 1.2.25.: Typische Beispiele für Expressionsmuster der Kandidaten-Gene aus dem Yeast One-Hybrid screen. Die meisten Gene zeigten ausschließlich eine starke Expression in den Nährzellen (A, Beispiel CG8273). In einigen Fällen wurde eine schwache Expression im gesamten Follikel-epithel beobachtet (B, Beispiel *NFAT*).

Gelretardationsexperimente mit *in vitro* translatierten Kandidatengenen

Um die Bindung der Kandidaten-Transkriptionsfaktoren an das 31bp *pipe*-Promotor-Fragment *in vitro* zu verifizieren, haben wir Gelretardationsexperimente (EMSAs, electrophoretic mobility-shift assays) durchgeführt (Fried and Crothers, 1981; Garner and Revzin, 1981). Die Methode des EMSA beruht darauf, dass die Bindung eines Proteins an ein DNA-Fragment zu einer Verringerung der elektrophoretischen Mobilität der proteingebundenen im Vergleich zur nicht gebundenen DNA führt. Verwendet man markierte DNA-Fragmente, ist die langsamere Wanderung der proteingebundenen im Vergleich zur freien DNA an einem so genannten „band-shift“ erkennbar.

Wir haben die Kandidaten-Gene zunächst unter Verwendung der BDGP-ESTs (Tabelle 2.2.) mit Hilfe von Kaninchen-Retikulozytenlysat oder Weizenkeim-Extrakt (Promega) transkribiert und translatiert. Die Proteine wurden danach mit einem radioaktiv markierten 31bp *pipe*-Promotor-Fragment inkubiert und auf ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Keines der Kandidaten-Proteine führte zur Retardation der Sonde, die in Form eines band-shifts

sichtbar wäre, so dass sich in keinem Fall eine Bindung *in vitro* nachweisen ließ (Tabelle 2.2.).

RNAi-Experimente

Schließlich haben wir, als einen ersten funktionalen *in vivo* Test, RNAi-Konstrukte für die einzelnen Kandidaten (mit Ausnahme von CG11876, für den keine entsprechende UAS-RNAi-Linie verfügbar war) im Follikel epithel ubiquitär exprimiert und phänotypische Auswirkungen auf den Embryo anhand von Kutikula-Präparaten untersucht. Dazu wurden Linien der VDRC-Sammlung (*Vienna Drosophila RNAi Center*, <http://www.vdrc.at/>; (Dietzl et al., 2007) verwendet, die jeweils kurze Gen-Fragmente als invertierte repeats (IRs) in antisense Orientierung in einem modifizierten pUAST-Vektor (pMF3) enthalten. Durch Einkreuzen einer Gal4-Treiberlinie lassen sich so hairpin-RNAs (hpRNAs) exprimieren, die einen spezifischen RNAi-Effekt bewirken sollen. Wir haben die Treiberlinie *Cy2-Gal4* verwendet, die eine starke Expression im gesamten Follikel epithel bewirkt. In keinem Fall konnten wir einen deutlichen Kutikula-Phänotyp identifizieren, der auf eine Störung der Dorsoventral-Achse schließen ließe (Tabelle 2.2.). Allerdings zeigten auch verschiedene, als positive Kontrollen getestete, UAS-RNAi-Konstrukte (*aos*, *rho-1*, *Mad*, *tlc*, *sog*) bei ubiquitärer Expression im Follikel epithel, unter Verwendung derselben Treiberlinie, nicht die zu erwartenden Effekte. Die Testexpression eines UAS-*aos*-RNAi-Konstrukts im Auge, unter Verwendung einer GMR-Gal4-Treiberlinie, erbrachte dagegen eindeutig den erwarteten Phänotyp (Gaby Altmann, persönliche Kommunikation). Prinzipiell funktioniert die verwendete *in vivo*-RNAi-Methode also durchaus, allerdings scheint es grundlegende Probleme bei der Anwendung im Follikel epithel zu geben, so dass die ermittelten negativen Ergebnisse für die Kandidaten-Gene aus dem Yeast One-Hybrid screen keine hohe Relevanz haben.

1.2.6.3 Gelretardations-Experimente (EMSA) mit Protein-Extrakt aus Ovarien

Um zu untersuchen, ob sich überhaupt für Ovarien-spezifische Proteine *in vitro* eine Bindung an das 31bp-*pipe*-Promotor-Fragment nachweisen lässt, haben wir Gelretardations-Experimente mit Gesamt-Protein-Extrakt aus Ovarien („crude tissue extract“, (Chung et al., 1996) durchgeführt. Wir haben dazu die gleiche Sonde (radioaktiv markiertes 31bp *pipe*-Promotor-Fragment) verwendet, wie für die EMSA-Experimente mit den Kandidatengenens des Yeast One-Hybrid screens (s. 1.2.6.2). Tatsächlich lässt sich nach Inkubation der Sonde mit Ovarien-Proteinextrakt ein eindeutiger band-shift erkennen, der auf die Bindung von Proteinen an das markierte Oligonukleotid zurückzuführen ist (Abb. 1.2.26., vergleiche Spur 3 und Spur 8). Die Zugabe verschiedener Konzentrationen (bis zu 1 ng, dem 10-fachen der eingesetzten Sonde) von unmarkierter Sonde als kaltem Kompetitor führt zu einer Reduzierung des Protein-Sonden-Komplexes, sichtbar an der schwächeren „band-shift-Bande“. Das deutet darauf hin, dass der beobachtete band-shift auf eine spezifische Bindung zurückzuführen ist, was sich durch die Inkubation mit einer „mutierten“ Sonde (lane 1) bestätigen lässt, da in diesem Fall gar kein band-shift auftritt. Die „mutierte“ Sonde wurde

nach denselben Regeln entworfen, wie im Falle der intern mutierten *pipe*-Reporterkonstrukte (s. Abb. 1.2.23.), das heißt, es wurde jede einzelne Base gegen eine nicht-komplementäre Base ausgetauscht.

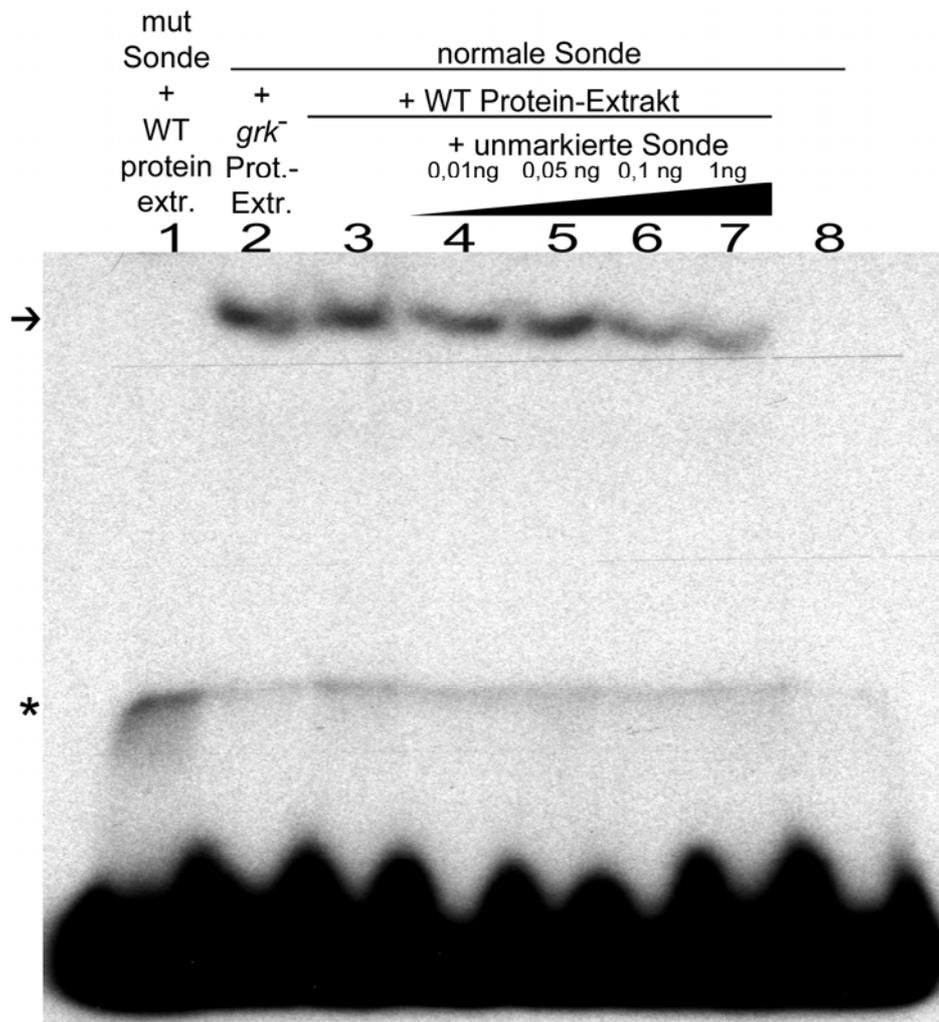


Abbildung 1.2.26.: EMSA mit Ovarien Protein Extrakt unter Verwendung einer radioaktiv markierten 31bp Repressor-Element Sonde. Spur 1: mutierte Sonde, inkubiert mit Wildtyp-Proteinextrakt (WPE); Spur 2: normale Sonde (31bp *pipe*-Promotor-Fragment) + Protein-Extrakt aus *grk*^{HF48}/*grk*^{2B6} Ovarien; Spur 3: WPE + normale Sonde; Spur 4-7: WPE + normale Sonde + ansteigende Mengen an nicht markierter Sonde; Spur 8: nur normale Sonde. Von der radioaktiv markierten Sonde wurde jeweils 0,1 ng eingesetzt (mutierte oder normale Sonde). Der Pfeil markiert den band-shift, der sowohl bei der Zugabe von *grk*^{HF48}/*grk*^{2B6} Protein-Extrakt, als auch von WPE auftritt (Spur 2+3). Der Stern markiert eine Bande, die vermutlich auf unspezifische Bindung zurückzuführen ist und auch im Falle der mutierten Sonde auftritt. Die in allen Spuren auftretende starke Bande am unteren Ende des Gels, geht auf „freie“, ungebundene Sonde zurück. Die Zugabe eines nicht markierten Oligonukleotids als Kompetitor reduziert die Konzentration des Sonden-Protein-Komplexes, sichtbar an dem schwächer werden der band-shift-Bande (Spur 2-4). Die mutierte Sonde zeigt bei Inkubation mit WPE keinen band-shift (Spur 1). Der band-shift geht somit auf eine spezifische Bindung eines oder mehrerer Proteine an das 31bp-DNA-Fragment zurück.

In vielen Fällen wird die Aktivität eines Transkriptionsfaktors direkt durch die Veränderung der DNA-Bindefähigkeit reguliert (z.B. mittels Phosphorylierung (Whitmarsh and Davis, 2000)). Da der von uns gesuchte Transkriptionsfaktor direkt über den EGFR-Signalweg aktiviert wird, sollte der Faktor in *gurken*-mutanten Ovarien inaktiv sein. Wir haben deshalb

untersucht, ob in Proteinextrakt aus *gurken*-mutanten Ovarien (*grk^{HF48}/grk^{2B6}* transheterozygote Weibchen), die Bindefähigkeit des Faktors beeinträchtigt ist. Der band-shift ist jedoch in vergleichbarer Stärke und Position auf dem Gel zu beobachten (lane 2). Da es sich hier um ein reines *in vitro* Experiment handelt, kann durch dieses Ergebnis noch nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete band-shift auf die Bindung eines EGFR-aktivierten Transkriptionsfaktors zurückzuführen ist. Viele Transkriptionsfaktoren werden über die intrazelluläre Lokalisation reguliert, indem zum Beispiel durch Phosphorylierung die Translokation in den Zellkern ermöglicht wird (Hill and Treisman, 1995; Hunter and Karin, 1992; Lin et al., 1998). Da der EMSA mit Protein-Extrakt aus homogenisiertem Gewebe durchgeführt wird, haben während der Inkubation des Protein-Extrakts mit der Sonde theoretisch auch solche Proteine die Möglichkeit an die Sonden-DNA zu binden, die *in vivo* nicht im Zellkern vorliegen.

1.3 Diskussion

1.3.1 Die dorsale Repression von *pipe* wird durch einen bisher nicht charakterisierten EGFR-regulierten Transkriptionsfaktor gesteuert

Die ventrale Restriktion der *pipe*-Expression, die für die dorsoventrale Achsenbildung des *Drosophila*-Embryos entscheidend ist, hängt direkt von der Aktivierung des EGFR-Signalwegs ab. Die für die dorsale Repression von *pipe* verantwortlichen Transkriptionsfaktoren konnten bisher jedoch nicht identifiziert werden. Die, mit Ausnahme von *Capicua* (s. u.), durchweg negativen Resultate der von uns durchgeführten klonalen Analyse mit Kandidaten der *pipe*-Regulation zeigen, dass alle bisher diskutierten potentiellen Transkriptionsfaktoren keine essentielle Rolle bei der Kontrolle des räumlichen Expressionsmusters von *pipe* spielen. Die Transkriptionsfaktoren Pnt und Yan wurden vor allem deshalb untersucht, weil es sich um die am besten untersuchten kanonischen Transkriptionsfaktoren downstream des EGFR-Signalwegs handelt. Auch *tramtrack* wird durch den EGFR-Signalweg reguliert und wird außerdem im Follikelepithel exprimiert. Die konkretesten funktionalen Resultate bezüglich einer Involvierung in die dorsoventrale Musterbildung des Embryos gibt es für den Transkriptionsfaktor CF2, allerdings beruhen alle diese Ergebnisse ausschließlich auf mittels Hitzeschock ektopisch exprimierten sense- oder antisense-Konstrukten. Insgesamt deuten die bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei dem entscheidenden Regulator, der für die EGFR-Signal vermittelte Repression von *pipe* verantwortlich ist, um einen bisher nicht charakterisierten Transkriptionsfaktor handelt. In der Tat gibt es nur für eine Minderheit (maximal 200) aller schätzungsweise ca. 1000 in *Drosophila* vorkommenden Transkriptionsfaktoren (Levine and Tjian, 2003) Informationen in Bezug auf die Bindestelle oder interagierende Proteine (Matys et al., 2003).

Obwohl eindeutig demonstriert worden ist, dass die Expression von *pipe* zellautonom durch den EGFR-Signalweg auf der dorsalen Seite der Eikammer reguliert wird (James et al., 2002; Peri et al., 2002), lässt sich durch die bisherigen Experimente nicht feststellen, ob die entscheidenden, an den *cis*-regulatorischen Bereich von *pipe* bindenden, Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt durch den aktivierten EGFR reguliert werden. Insgesamt sind vier stark vereinfachte Haupt-Modelle der *pipe*-Regulation denkbar (Abb.1.3.1): A) „direkte Repression“, B) „direkte Inaktivierung“, C) „indirekte Repression“ oder D) „indirekte Inaktivierung“. Bei den beiden Modellen der direkten Regulation (A, B) wird die Aktivität des an den *pipe*-Promotor bindenden Transkriptionsfaktors (Aktivator A oder Repressor R) direkt durch Phosphorylierung downstream des EGFR reguliert. Im Fall der indirekten Regulation (C, D) wird jeweils die Aktivität eines Transkriptionsfaktors X durch den EGFR-Signalweg (durch Phosphorylierung) gesteuert, der daraufhin die Transkription desjenigen Transkriptionsfaktors (R oder A) reguliert, der auf der Ebene des *pipe*-Promotors wirkt. Natürlich ist auch eine Kombination mehrerer Modelle denkbar.

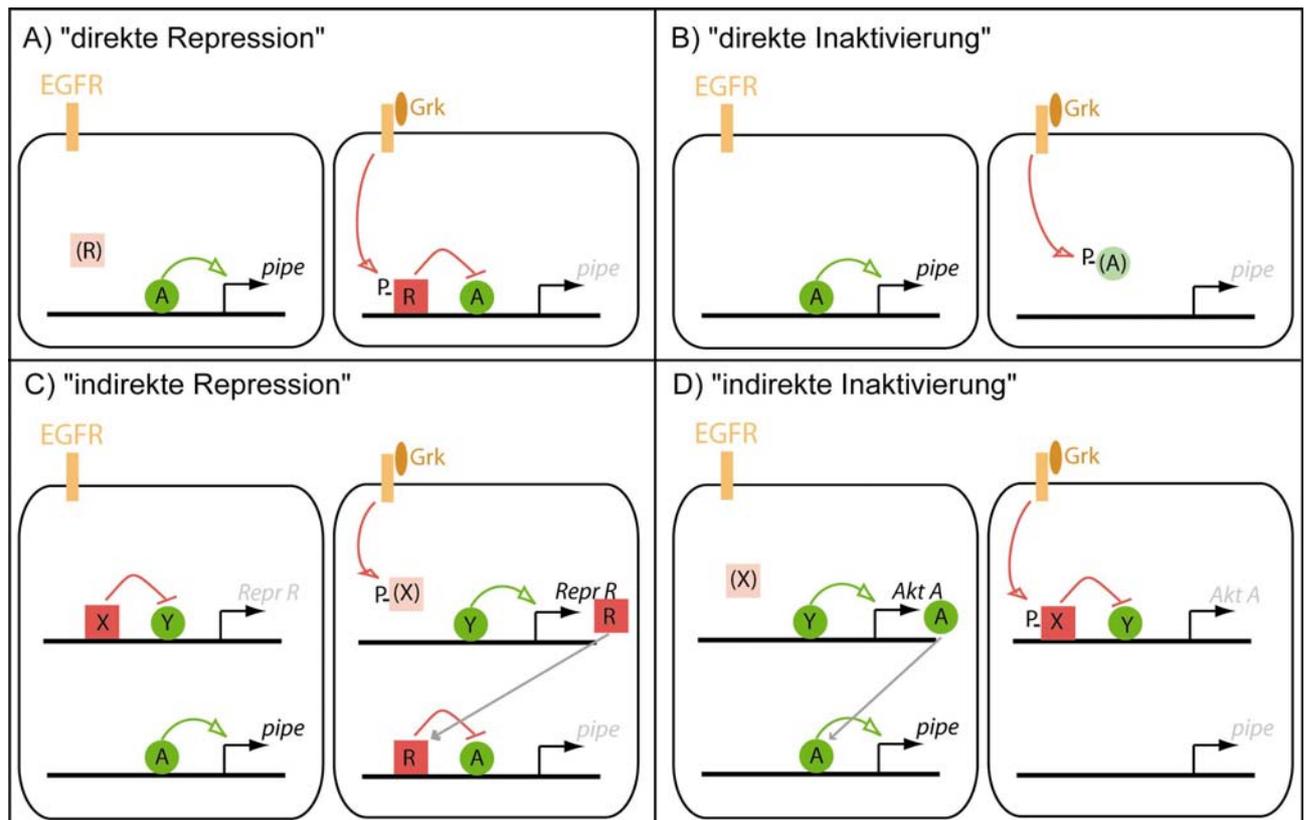


Abbildung 1.3.1.: Modelle der *pipe*-Regulation. Gezeigt sind vier verschiedene, stark vereinfachte, potentielle Modelle der EGFR-vermittelten, räumlichen Transkriptionsregulation von *pipe*. R, A auf Ebene des *pipe*-Promotors agierender Repressor (R), bzw. Aktivator (A); X, Y = für die Transkriptionsregulation von R oder A zuständiger Repressor (X), bzw. Aktivator (Y), P = Phosphorylierung downstream des EGFR. Pfeilspitzen stehen für einen aktivierenden, Balken für einen inhibitorischen Einfluss.

Die Identifizierung einer Repressorbindestelle im Rahmen der *pipe*-Promotor-Analyse deutet auf den entscheidenden Einfluss eines direkt an den *pipe*-Promotor bindenden Repressors hin, so dass auf jeden Fall eines der Modelle A oder C eine Rolle spielen dürfte. Ob der an dieser Stelle des *pipe*-Promotors agierende Repressor aber direkt oder indirekt über den EGFR-Signalweg reguliert wird, lässt sich bisher nicht sagen.

Der einzige Transkriptionsfaktor, der in der klonalen Analyse einen eindeutigen Effekt auf die Expression von *pipe* zeigte, ist Cic, welcher als essentieller Aktivator benötigt wird. Wie bereits im Ergebnisteil ausgeführt, schließen wir jedoch, aufgrund der uniformen Verteilung von Cic im gesamten Follikelepithel während der entscheidenden Oogenesestadien, eine ausschlaggebende Funktion von Cic bei der ventralen Restriktion der *pipe*-Expression aus. Cic kann jedoch sowohl im Rahmen der direkten (Modell A), als auch der indirekten Repression (Modell C) eine Rolle spielen, da in beiden Fällen allein der direkt oder indirekt durch das EGFR-Signal regulierte Repressor R für die dorsale Repression verantwortlich ist.

1.3.2 Die *cis*-regulatorische Region von *pipe* ist modular aufgebaut

Die partiellen Expressionsmuster, die bei einigen unserer Promotor-Deletions-Konstrukte auftreten (Abb. 1.2.19. u. 1.2.21.A, J, K), deuten auf weitere Aktivatoren hin, die - im Gegensatz zu dem im gesamten Follikel epithel benötigten Faktor *Cic* - für die Expression von *pipe* in Teilbereichen des Follikel epithels verantwortlich sind. Ähnliche Teilexpressionsmuster wurden auch für *pipe*-Promotor-Konstrukte beobachtet, die Teile des ersten Introns von *pipe* umfassten (unveröffentlichte Daten Francesca Peri und Diplomarbeit Martin Technau). Da wir zeigen konnten, dass ein upstream gelegener Enhancer für die wildtypische *pipe*-Expression in ventralen Follikelzellen ausreichend ist, deuten diese Intron-Reporterkonstrukte auf redundante *cis*-regulatorische Bereiche hin. (Ein weiteres redundantes Enhancer-Element, welches die Expression eines *LacZ*-Reportergens im wildtypischen *pipe*-Muster antreibt, ist außerdem downstream der codierenden Region von *pipe* identifiziert worden (Sergeev et al., 2001).) Im Falle der oben genannten Intron-Reporterkonstrukte wurde neben einer rein posterioren Expression, wie für die in dieser Arbeit aufgeführten Konstrukte 2000-3000-*LacZ*, 1000-1300-*LacZ* und 1050-1300-*LacZ* (Abb. 1.2.21. A, J, K), außerdem ein Expressionsmuster gefunden, in dem nur die Expression im mittleren Bereich der Eikammer ausbleibt, in dem es sich also um eine gleichzeitige Teilexpression am anterioren und am posterioren Ende der Eikammer handelt. Dabei beschränkte sich die Expression jeweils, wie auch für die in Abbildung 1.2.21. gezeigten Muster, ausschließlich auf die ventrale Seite der Eikammer.

Insgesamt deuten die unterschiedlichen Teilexpressionsmuster auf einen modularen Aufbau der *cis*-regulatorischen Region des *pipe*-Gens hin. Dabei sind wahrscheinlich zumindest für den anterioren, den mittleren und den posterioren Teilbereich der *pipe*-Expressionsdomäne jeweils unterschiedliche Aktivator-Bindestellen, und somit unterschiedliche Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Tatsächlich sind ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung der *cis*-regulatorischen Region eines Chorion Gens (*s36*) gemacht worden (Tolias and Kafatos, 1990; Tolias et al., 1993). Die Promotor-Analyse dieses *s36 chorion Gens*, das ubiquitär im gesamten Follikel epithel exprimiert wird, demonstrierte, dass eine so genannte proximale regulatorische Region (PRR) des *s36*-Promotors spezifisch die Expression eines Reportergens in den Follikelzellen an den beiden Termini bewirkt. Diese PRR ließ sich wiederum in zwei unterschiedliche Abschnitte aufteilen, welche jeweils die Expression ausschließlich in den anterioren, bzw. den posterioren Follikelzellen antrieben. An diesem Promotor eines im Follikel epithel der Eikammer exprimierten Gens konnte also erstmalig konkret demonstriert werden, dass eine durchgehende Expressionsdomäne im gesamten Follikel epithel aus mehreren, getrennt regulierten Teildomänen zusammengesetzt sein kann, die sich jeweils durch die Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren an unterschiedliche *cis*-regulatorische Teilbereiche ergeben. Im Fall von *pipe* scheint jedoch dieser modulare Aufbau nur für die Aktivator-Bindestellen zu gelten, während wahrscheinlich ein einziger Repressor für die EGFR-vermittelte, dorsale Repression verantwortlich ist.

1.3.3 Eine kompetitive Bindung von Aktivator und Repressoren an das identifizierte Bindemotiv kann ausgeschlossen werden

Auf die grobe Unterscheidung von long-range- und short-range-Repressoren wurde bereits im Ergebnis-Teil kurz eingegangen. Es gibt Hinweise, dass die Distanz, über die hinweg ein short-range-Repressor wirken kann, von der Repressor-Konzentration abhängt. Es ist daher vorgeschlagen worden, dass short-range-Repressoren insbesondere geeignet sind, auf einen Transkriptionsfaktor-Konzentrationsgradienten zu reagieren (Hewitt et al., 1999). Aufgrund der Möglichkeit, dass die dorsale Repression von *pipe* direkt durch einen Gurken-Konzentrations-Gradienten reguliert wird, scheint damit ein short-range Repressionsmechanismus bei der *pipe*-Regulation nahe liegend. Man unterscheidet drei Hauptarten der typischen short-range-Repression, die sich unter anderem in der Anordnung der Aktivator- und Repressorbindungsstellen innerhalb der regulatorischen Region des Zielgens unterscheiden (Gaston and Jayaraman, 2003; Kulkarni and Arnosti, 2005): 1) „Kompetitive Bindung“: Repressoren verhindern die DNA-Bindung von Aktivator aufgrund überlappender Repressor- und Aktivator-Bindestellen (Gray and Levine, 1996a; Gray and Levine, 1996b); 2) „Quenching“: Repressoren und Aktivator binden gleichzeitig an unabhängigen, benachbarten Bindestellen, wobei die Repressoren die Interaktion der Aktivator mit der generellen Transkriptionsmaschinerie inhibieren (Arnosti et al., 1996; Gray and Levine, 1996a; Gray et al., 1994); 3) „Direkte“ Repression (auch aktive oder dominante Repression): Repressoren und Aktivator binden an unabhängigen Bindestellen, wobei die Repressoren direkt mit der generellen Transkriptionsmaschinerie (GTM) interagieren (Arnosti et al., 1996; Gray and Levine, 1996a; Latchman, 1996). Die beobachtete ektopische Expression im gesamten Follikelepithel, die bei der Deletion oder Mutation der Repressor-Bindestelle auftritt, schließt die kompetitive Bindung von essentiellen Aktivator und Repressoren an dieselbe Bindestelle aus, da in diesem Fall der Verlust dieser Bindestelle zu einem völligen Ausbleiben der Expression führen müsste. Bei der Repression von *pipe* sind jedoch sowohl der Mechanismus des Quenching als auch die direkte Repression denkbar. Im Falle der direkten Repression ist allerdings in mehreren Fällen gezeigt worden, dass eine Bindung des Repressors in direkter Nähe (~ 100bp) des basalen Promotors notwendig ist (Arnosti et al., 1996; Gray and Levine, 1996a; Kulkarni and Arnosti, 2005), die von uns identifizierte Repressor-Bindestelle ist dagegen deutlich weiter entfernt (~1100 bp). Der Mechanismus des Quenching ist im Rahmen unserer Ergebnisse besonders wahrscheinlich, da in diesem Fall die Aktivität jedes Aktivators in der Umgebung von bis zu 100 bp zur Repressorbindestelle inhibiert wird (Gray and Levine, 1996a). Die Spezifität der Repression hängt dabei tatsächlich vor allem von der Lokalisation des gebundenen Repressors und nicht von der Art des Aktivators ab. Auch das stimmt mit den Ergebnissen der *pipe*-Promotor-Analyse überein, da wir als Folge der Manipulation der Repressor-Bindestelle eine weitgehende Derepression für das gesamte Follikelepithel beobachten, obwohl es wahrscheinlich unabhängige Aktivator für unterschiedliche Bereiche des Follikelepithels gibt (s.o.). Allerdings führt auch die direkte Repression der GTM zu einer allgemeinen Inhibition der Expression, unabhängig von der Art der gebundenen Aktivator. Die Methode des Quenching ist auch in anderen Arbeiten als die wichtigste Methode der short-range-Repression identifiziert worden (Kulkarni and Arnosti, 2003; Kulkarni and Arnosti, 2005). Der Quenching-Mechanismus bietet insbesondere die

Möglichkeit, Proteine gleichzeitig als Aktivatoren und Repressoren zu nutzen. Während zwei unterschiedliche Aktivatoren als separate DNA-gebundene Proteine Aktivierung vermitteln, führt der Kontakt der beiden in direkter Nachbarschaft gebundenen Faktoren zur Inhibierung ihrer Aktivität (Diamond et al., 1990; Jiang et al., 1992). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Wirkung eines Transkriptionsfaktors als Aktivator oder Repressor auch vom jeweiligen Kontext abhängen kann. Auch die strenge Unterteilung in short-range- und long-range-Repressoren ist nicht immer möglich, da zum Beispiel einige short-range-Repressoren, genau wie für long-range-Repressoren gezeigt worden ist (Chen et al., 1999; Choi et al., 1999; Watson et al., 2000; Wu et al., 2001) auch über die Veränderung der Chromatin-Struktur durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen wirken können (Criqui-Filipe et al., 1999; Struffi and Arnosti, 2005; Sundqvist et al., 1998; Zhang et al., 2001a). Dabei ist im Falle der short-range-Repressoren die Veränderung der Chromatin-Struktur lokal begrenzt, weil die bei long-range-Repressoren stattfindende Ausweitung auf einen größeren DNA-Bereich unterbleibt. Da eine Veränderung der Chromatin-Struktur unspezifisch im Bezug auf die vorliegenden Aktivatoren ist, kann auch ein derartiger Wirkungsmechanismus im Falle der *pipe*-Repression nicht ausgeschlossen werden.

Auch in Bezug auf die Corepressoren Groucho und CtBP ist eine strikte Trennung zwischen den Mechanismen der long-range- und der short-range-Repression nicht immer möglich, da für eine vollständige Repression bestimmter Gene die kombinierte Aktivität von Groucho und CtBP benötigt wird (Cinnamon et al., 2004; Hasson et al., 2001; Nagel et al., 2005). Es wäre daher interessant, den Einfluss von *gro/CtBP*-doppelt-mutanten Zellklonen auf das *pipe-LacZ*-Expressionsmuster zu untersuchen. Darüber hinausgehend gibt es jedoch keine offensichtlichen Kandidaten für Transkriptionsfaktoren, die als Regulatoren der *pipe*-Expression in Frage kommen.

1.3.4 Sekundäre Signalwege spielen bei der dorsalen Repression von *pipe* keine entscheidende Rolle

Bereits vor Durchführung dieser Arbeit konnte der Einfluss der meisten Signalwege, für die ein sekundärer Einfluss auf die *pipe*-Expression vermutet wurde, aufgrund klonaler Experimente mit entscheidenden Komponenten dieser Signalwege ausgeschlossen werden. Konkret getestet wurde insbesondere eine Beteiligung des FGF- und des JNK-Signalweges, sowie ein Einfluss des Notch-Signalweges über die Wirkung von *mirror* und *fringe* ((Peri et al., 2002) und Diplomarbeit Martin Technau).

Der einzige weitere Signalweg, für den in den letzten Jahren ein potentieller Einfluss auf *pipe* diskutiert worden ist, ist der Dpp-Signalweg (Dissertation Bhupendra Shrivage und Francesca Peri). Dabei beruhen die Hinweise auf eine mögliche Involvierung bei der Transkriptionsregulation von *pipe* vor allem auf Experimenten, in denen ein Einfluss auf die *pipe*-Expression durch ektopische Aktivierung der Dpp-Signalkaskade gezeigt wurde. Die von uns durchgeführte loss-of-function-Analyse mit zwei unterschiedlichen Komponenten des Dpp-Signalweges (*med* und *tkv*) demonstriert eindeutig, dass auch dieser Signalweg keine Rolle bei der Regulation der *pipe*-Expression spielt. Damit deutet alles darauf hin, dass tatsächlich ausschließlich der Grk-aktivierte EGFR-Signalweg für die ventrale Restriktion der *pipe*-Expression verantwortlich ist. Die Identifizierung des downstream des EGFR-

Signalwegs agierenden Transkriptions-Repressors stellt daher einen entscheidenden Schritt bei der Aufklärung der *pipe*-Regulation dar.

1.3.5 Die identifizierte Repressor-Bindestelle ermöglicht die Isolierung des *pipe*-Repressors mittels biochemischer Methoden

Um den entscheidenden Repressor zu identifizieren, der auf der Ebene des *pipe*-Promotors für die dorsale Inhibition der Transkription verantwortlich ist, bietet das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Repressor-Bindestellen-Element die aussichtsreichsten Möglichkeiten. Durch die Einschränkung auf einen Bereich von 31 bp ist das relevante Promotor-Fragment weit genug eingengt, um für weitere biochemische Methoden eingesetzt zu werden. Die zumeist verwendete Methode, um einen Transkriptionsfaktor zu ermitteln, der an ein definiertes DNA-Fragment bindet, ist ein Yeast One-Hybrid screen. Wir konnten mit Hilfe dieser Methode jedoch keinen Transkriptionsfaktor identifizieren, dessen Relevanz sich in nachfolgenden Experimenten bestätigen ließ. Das Hauptproblem war dabei der viel zu hohe Hintergrund an falsch positiven Kolonien, der die Relevanz der identifizierten Transkriptionsfaktoren von vornherein in Frage stellte. Zu falsch positiven Kolonien in Yeast-One-Hybrid-Screens führen häufig vor allem hoch exprimierte Gene, deren Transkripte in der verwendeten cDNA Bibliothek in großer Kopienzahl vorhanden sind ((Wen et al., 2000a); persönliche Kommunikation Stephan Wenkel). Ungünstigerweise kommen aber gerade die mRNAs vieler Transkriptionsfaktoren in eukaryotischen Zellen nur in sehr geringer Kopienzahl vor (Pabo and Sauer, 1992). Es ist gut möglich, dass unter diesem Gesichtspunkt die Ovarien von *Drosophila* eine besonders ungünstige Quelle für eine cDNA Bibliothek darstellen, da in den polyploiden Nährzellen und Follikelzellen viele Gene in sehr großer Zahl exprimiert werden, wobei zum Beispiel die Chorion Gene zusätzlich zur allgemeinen Polyploidie auch noch spezifisch amplifiziert werden (Orr-Weaver, 1991). Um das Problem der ungleichen Transkriptmenge unterschiedlicher Gene zu umgehen, können cDNA Bibliotheken normalisiert werden, bevor sie für das Screening eingesetzt werden (Bonaldo et al., 1996; Soares et al., 1994). Dabei wird der Anteil im Überschuss vorliegender mRNAs spezifisch verringert, wohingegen niedrig exprimierte mRNAs selektiv amplifiziert werden. Im Rahmen des von uns verwendeten Yeast-One-Hybrid Systems (*Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit verwendet, Clontech*) war eine Normalisierung der cDNA-Bibliothek jedoch nicht möglich, da diese im Rahmen des vom Hersteller mitgelieferten Kits hergestellt werden musste, um eine Integration in den Beute-Vektor mittels homologer Rekombination innerhalb der Hefezellen zu ermöglichen. Ein zusätzliches Problem bei der Durchführung des Screens, das auch eine weitere Erklärung für den hohen Hintergrund falsch positiver Klone bietet, war die relativ hohe Konzentration an 3-AT, die wir zur Inhibition der Hintergrund-Expression des Reportergens einsetzen mussten. Obwohl laut Benutzerhandbuch zum von uns verwendeten Kit auch noch mit einer Konzentration von 100 mM gearbeitet werden kann, sind Inhibitor-Konzentrationen von 15-20 mM optimal (persönliche Kommunikation Stefan Wenkel, Angelike Stathopoulos und technischer Kundendienst Clontech). Es wäre daher in unserem Fall möglicherweise von Vorteil gewesen, nur eine einzige Kopie des 31bp Repressor-Bindestellen-Fragments in den Reportervektor zu klonieren, statt der allgemein empfohlenen mehrfachen Kopien (in

unserem Fall 3 Kopien). Auch der Einsatz autonom replizierender Plasmide im Rahmen des von uns verwendeten Kits, im Gegensatz zu den klassischerweise stabil in das Hefe Genom integrierten Vektoren, ist wahrscheinlich von Nachteil und mit verantwortlich für den hohen Hintergrund an falsch positiven Kolonien (persönliche Kommunikation Angelike Stathopoulos). Schließlich stellt möglicherweise auch die Tatsache, dass es sich bei dem von uns verwendeten Kit um ein sehr neues Produkt handelt, welches noch nicht vielfach benutzt und getestet worden ist, einen Nachteil dar. In der Tat ist beispielsweise das Benutzer-Handbuch des Kits inzwischen vollständig überarbeitet und an vielen Stellen deutlich verändert worden.

Die Tatsache, dass in einem EMSA das 31bp Repressor-Bindestellen-Fragment eine spezifische Bindung an Protein(e) aus Ovarien-Gesamt-Proteinextrakt zeigt, bietet einen optimalen Ausgangspunkt für weitere Experimente. Damit wird vor allem eine weitere Einschränkung, bzw. Spezifizierung der relevanten Sequenz erleichtert, da der Test veränderter DNA-Fragmente im Rahmen eines EMSA deutlich schneller und einfacher ist, als die Klonierung und Expressions-Analyse einer großen Zahl weiterer Promotor-Reporter-Konstrukte. Auch DNaseI-Footprinting Experimente (Galas and Schmitz, 1978) zur genaueren Spezifizierung des relevanten Sequenzbereichs sind möglich. Die *in vivo*-Verifizierung mittels Reporterkonstrukten kann daher in Zukunft auf wenige Konstrukte begrenzt werden, die im Rahmen weiterer *in vitro*-Experimente interessant erscheinen.

Insbesondere bietet die beobachtete *in vitro*-Bindung an das 31bp-DNA-Fragment jedoch die Möglichkeit, das bindende Protein durch biochemische Methoden zu identifizieren. Zum Beispiel können Biotin-markierte DNA-Fragmente in Kombination mit Streptavidin-verknüpften magnetischen Mikro-beads eingesetzt werden, um die gesuchten Proteine über geeignete Säulen in einem magnetischen Feld aufzureinigen (z.B. *μMACS™ FactorFinder Kit* von *Milteny Biotec*). Nachfolgend lassen sich die an das DNA-Fragment gebundenen Proteine zunächst durch SDS-PAGE auftrennen und schließlich massenspektrometrisch identifizieren.

1.3.6 Die funktionell relevanten Bereiche der *pipe*-upstream-Region sind evolutionär hoch konserviert

Die bioinformatische Analyse der Promoter-Region von *pipe* hat zur Identifizierung eines *cis*-regulatorischen Motivs („Motiv B“) geführt, dessen Relevanz durch die *in vivo* Analyse von Reporter-Konstrukten verifiziert werden konnte. Dabei zeigte sich außerdem, dass dieses funktional relevante Motiv in einem besonders hoch konservierten Bereich der upstream-Region von *pipe* lokalisiert ist (Abb. 1.2.12.). Auch für den mittels terminal deletierter Promotorkonstrukte eingegrenzten gesamten Enhancer-Bereich korreliert die Konservierung mit der experimentell ermittelten Relevanz. Der Vergleich der verschiedenen Reporterkonstrukte (Abb. 1.2.19.) deutet daraufhin, dass das essentielle *cis*-regulatorische Modul insgesamt in dem Bereich von 985 bis 1135 bp upstream des Transkriptionsstartes lokalisiert ist. Dabei handelt es sich um den Sequenz-Bereich, der sich von Motiv A bis zu 35 bp upstream von Motiv B erstreckt. Die in Abbildung 1.2.12. markierte Lage der Motive macht deutlich, dass genau in diesem Bereich insgesamt eine hohe Konservierung vorliegt.

Die Konservierung der *cis*-regulatorischen Region von *pipe* unterstreicht die Nützlichkeit des phylogenetischen Ansatzes bei der Suche nach potentiellen TFBS.

Die Beobachtung, dass in unserem Fall die Konservierung der Sequenz tatsächlich ein sehr verlässlicher Indikator für die regulatorische Funktion ist, trifft bei *Drosophila* jedoch nicht allgemein auf *cis*-regulatorische Bereiche zu. Obwohl in einigen Arbeiten vergleichbare Resultate erzielt worden sind (Grad et al., 2004; Macdonald and Long, 2005; Sinha et al., 2004), haben verschiedene Studien gezeigt, dass in vielen Fällen *cis*-regulatorische Sequenzen nicht deutlich stärker konserviert sind, als benachbarte nicht-funktionale Sequenzen (Berman et al., 2004; Emberly et al., 2003; Moses et al., 2006; Wittkopp, 2006). Insbesondere lässt sich in vielen Fällen eine funktionelle Konservierung, trotz deutlich divergierender Sequenzen, nachweisen (Ludwig et al., 2000; Ludwig et al., 1998; Magoulas et al., 1993; Wolff et al., 1999).

Um das Ausmaß der Konservierung für den gesamten *pipe*-Enhancer genauer zu bestimmen, ist es zunächst einmal notwendig, weitere funktionell relevante *cis*-regulatorische Motive zu identifizieren, um die Konservierung für weitere diskrete Motive zu ermitteln. Es ist durchaus möglich, dass die 100%ige Identität des Motiv B bis hin zu *Drosophila pseudoobscura* einen Extremfall darstellt, und dass andere funktionell relevante Motive eine deutlich geringere Konservierung aufweisen. Bisher war es uns noch nicht möglich, eine potentielle Aktivator-Bindestelle exakter zu definieren. Die beiden von verschiedenen Vorhersage-Programmen parallel identifizierten Motive A und C zeigten im Falle einer Deletion in Reporterkonstrukten keine funktionelle Relevanz. Allerdings ist es denkbar, dass beide Motive gleichzeitig betroffen sein müssen, um einen Effekt zu zeigen. Es könnte sich beispielsweise um redundante Bindestellen für denselben Transkriptionsfaktor handeln, insbesondere da einige Programme beiden Motiven ein gemeinsames Konsensusmotiv zuordnen. Es ist gezeigt worden, dass in der Tat die Anzahl von Bindestellen für einen Transkriptionsfaktor höher ist, je variabler die Bindestelle für diesen Faktor ist, und dass besonders hoch konservierte Bindestellen speziell im Fall von nur einfach gebundenen Transkriptionsfaktoren auftreten (Bilu and Barkai, 2005).

Ein guter Ausgangspunkt für die weitere Promotoranalyse ist daher ein Reporterkonstrukt, in dem die beiden Motive A und C parallel mutiert sind.

1.3.7 Die evolutionäre Konservierung von *pipe*

Wie in der Einleitung genauer ausgeführt, geht die Etablierung der dorsoventralen Achse des *Drosophila* Embryos auf ein lokalisiertes Signal zurück, welches innerhalb des Perivitellin-Bereichs des Eies, als Folge einer Serin-Protease-Kaskade generiert wird. Bei der räumlichen Regulation dieser Kaskade hat *pipe* eine Schlüsselfunktion, da es das einzige bisher identifizierte, in diesen Prozess involvierte Gen ist, das eine asymmetrische Expression im Follikel epithel zeigt.

Diese herausragende Rolle von *pipe* deutet auf eine möglicherweise konservierte Funktion von *pipe* bei der dorsoventralen Musterbildung innerhalb der Insekten hin. Die hohe Konservierung von *pipe* innerhalb der *Drosophiliden* konnten wir im Rahmen dieser Arbeit bei der Analyse des *cis*-regulatorischen Bereichs selbst beobachten (Abb. 1.2.12.). In

anderen *Drosophiliden* lassen sich ebenfalls verschiedene Isoformen identifizieren, dabei ist die Konservierung in Bezug auf die 11 unterschiedlichen, in *D. mel.* vorkommenden Splice-Varianten, am höchsten für die Sulfotransferasebox, die innerhalb der im ventralen Follikelepithel exprimierten Isoform vorkommt und für die eine Rolle bei der dorsoventralen Musterbildung nachgewiesen worden ist (*pipe-ST2*, bzw. *pipe-RA* (Sen et al., 1998)). In der Tat lassen sich hoch konservierte *pipe*-Homologe aber auch in allen anderen bisher sequenzierten Insekten finden (Dissertation Patrick Kalscheuer und persönliche Kommunikation Jeremy Lynch). In diesen Organismen wird jeweils nur eine einzelne Pipe Isoform codiert, diese zeigt jedoch wiederum die höchste Homologie zu *Drosophila* Pipe-ST2 (Dissertation Patrick Kalscheuer, Zhu et al., 2005). Es ist daher wahrscheinlich, dass nur die Pipe-ST2 Isoform in dem gemeinsamen Vorfahren vorgekommen ist, was wiederum nahe legt, dass die ancestrale Rolle von *pipe* die Funktion bei der Regulation der dorsoventralen Musterbildung des Embryos darstellt.

Das *Anopheles gambiae* *pipe*-Homolog wird, wie bei *Drosophila*, asymmetrisch auf der ventralen Seite der Eikammer exprimiert (Dissertation Patrick Kalscheuer). Auch die Expression der *pipe*-Homologen in *Nasonia vitripennis*, *Gryllus bimaculatus*, *Oncopeltus fasciatus* und *Tribolium castaneum* ist untersucht worden, dabei konnte jedoch in keinem Fall eine asymmetrische Expression beobachtet werden (unveröffentlichte Daten Jeremy Lynch). Im Fall von *Nasonia vitripennis* und *Tribolium castaneum* gibt es auch funktionale Untersuchungen mittels parentaler RNA-Interferenz (pRNAi, Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) in Adulte oder Puppen und nachfolgende Analyse der Nachkommen (Bucher et al., 2002; Lynch and Desplan, 2006)). Dabei zeigte sich jedoch in beiden Fällen kein dorsoventraler Musterbildungs-Defekt, so dass es bisher außerhalb der *Dipteren* keine Hinweise auf eine konservierte Funktion von *pipe*-Homologen bei der dorsoventralen Musterbildung gibt (Jeremy Lynch, persönliche Kommunikation). Auch für *Anopheles gambiae* ist der einzige Hinweis auf eine entsprechende Funktion allein das erwähnte, asymmetrische Expressionsmuster.

Genau wie alle anderen zehn in *D. mel.* vorkommenden Pipe Isoformen, wird auch die Pipe-ST2 Isoform, in den Speicheldrüsen exprimiert, und es gibt Hinweise, dass *pipe* tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung oder der Funktion der Speicheldrüsen spielt (Zhu et al., 2005). Demzufolge könnte die ancestrale Rolle von *pipe* auch eine Funktion innerhalb dieses Organs sein, so dass die Funktion bei der Bildung der Dorsoventral-Achse erst später hinzugekommen ist. Es wäre daher interessant zu prüfen, ob die in anderen Insekten vorkommenden Pipe-Homologe jeweils in den Speicheldrüsen exprimiert werden.

Es gibt außerdem Hinweise, dass die Transkription von *pipe* auch innerhalb der Speicheldrüsen durch ein EGFR-Signal reprimiert wird (Sergeev et al., 2001). Daher sollten *D.mel.* auch die Expressionsmuster der verschiedenen *pipe-LacZ*-Reporterkonstrukte in diesem Organ analysiert werden.

Auch die zentrale Rolle von Pipe als Schlüsselfaktor der dorsoventralen Musterbildung des *Drosophila*-Embryos ist neuerdings in Frage gestellt worden. So ist berichtet worden, dass die Hitzeschock-induzierte, uniforme Expression der *pipe-ST2* mRNA die Bildung der

embryonalen Dorsoventral-Achse in einem *pipe*-mutanten Hintergrund retten kann (Dave Stein, persönliche Kommunikation). Diese Beobachtung würde in der Tat bedeuten, dass die ventrale Restriktion von *pipe* nicht essentiell ist, und dass es einen weiteren, bisher nicht identifizierten Faktor geben muss, der entweder alleine oder in redundanter Weise mit Pipe für die ventrale Induktion der Protease-Kaskade entscheidend ist.

Die von uns im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Promotor-Fragmente bieten eine gute Möglichkeit, die Relevanz der ventralen *pipe*-Expression zu überprüfen. Die Expression eines Pipe-ST2 Rettungs-Konstrukts unter der Kontrolle des von uns identifizierten, minimalen *pipe*-Enhancers, sollte zu einer Rettung der *pipe*-Mutation führen. Dadurch ließe sich insbesondere nachweisen, dass der identifizierte Enhancer tatsächlich für eine Expression im endogenen *pipe*-Muster ausreicht. Im Gegensatz dazu stellt eines der *pipe*-Promotor-Fragmente, die zu einer uniformen Expression von *pipe* im gesamten Follikelepithel führen, ein optimales Werkzeug dar, um die Pipe-ST2 Isoform uniform im *pipe*-mutanten Hintergrund zu exprimieren. Der Vergleich eines mit Hilfe dieser unterschiedlichen Promotor-Fragmente einmal ventral und im anderen Fall uniform exprimierten „Rettungs-Konstruktes“ kann klaren Aufschluss darüber geben, ob die ventrale Restriktion der *pipe*-Expression für die dorsale Musterbildung des Embryos essentiell ist.

Teil 2: Analyse der KASH- und der SUN-Domänen-Proteine in der Oogenese von *Drosophila melanogaster*

2.1 Einleitung

Die exakte Lokalisierung des Zellkerns an einer spezifischen Position innerhalb der Zelle spielt in vielen Zelltypen eine entscheidende Rolle. Die korrekte Positionierung des Zellkerns hängt dabei von zwei unterschiedlichen Prozessen ab, die jedoch in der Regel miteinander in Beziehung stehen. Dabei handelt es sich zum einen um die Wanderung des Kerns zum genauen Zielort innerhalb der Zelle und zum anderen um dessen stabile Verankerung an dieser Stelle. Unterschiedliche Studien zeigen, dass bei beiden Prozessen sowohl das Mikrotubuli-, als auch das Aktin-Cytoskelett eine wichtige Rolle spielt (Bloom, 2001; Gomes et al., 2005; Morris, 2000; Reinsch and Gonczy, 1998; Starr, 2007; Starr and Han, 2003; Suelmann and Fischer, 2000).

Die Entwicklung der Eikammer während der Oogenese von *Drosophila* stellt ein ideales Modellsystem für die Analyse verschiedener Aspekte der Kernpositionierung dar. Wie in der Einleitung zu Teil I (Kapitel 1.1.) beschrieben, wandert der Oocytenkern während des Stadiums 7 der Oogenese in einem Mikrotubuli-abhängigen Prozess vom posterioren Ende der Eikammer zu einer anterior kortikalen Position, wodurch im Endeffekt die dorsale Seite der Eikammer definiert wird. Um eine korrekte Ausbildung der dorsoventralen Achse von Ei und Embryo zu gewährleisten, muss der Kern konstant an der neuen Position verankert werden. Mutationen, in denen die anteriore Kern-Wanderung zunächst normal vollzogen wird, in denen der Kern aber im weiteren Verlauf der Oogenese nicht stabil an der anterior-kortikalen Position verbleibt, führen zu starken Defekten der dorsoventralen Musterbildung (Guichet et al., 2001). Es gibt Hinweise, dass die Motorproteine Kinesin und Dynein in der Oocyte, neben der gut untersuchten Funktion bei der Kern-Wanderung auch in die Verankerung des Oocytenkerns involviert sind (Brendza et al., 2002; Duncan and Warrior, 2002; Januschke et al., 2002; Swan et al., 1999).

Auch innerhalb der Nährzellen spielt die Positionierung der Kerne eine wichtige Rolle. Während eines späten Stadiums der Oogenese (ab Stadium 10B) wird das gesamte Cytoplasma der Nährzellen innerhalb kurzer Zeit über die Ringkanäle in die Oocyte übertragen, ein Prozess, der als Nährzell-Dumping bezeichnet wird (Guild et al., 1997; Robinson et al., 1997; Spradling, 1993). Für das Nährzell-Dumping spielt insbesondere das Aktin-Cytoskelett eine entscheidende Rolle. Verschiedene Unterpopulationen von Aktinfilamenten sind in den Dumping-Prozess involviert. Neben dem Aufbau der Ringkanäle und der subkortikalen Aktin-Schicht entlang der Plasmamembranen der Nährzellen, die eine Funktion bei der Kontraktion der Nährzellen während des Dumpings haben (Cooley et al., 1992; Gutzeit, 1986; Warn et al., 1985; Wheatley et al., 1995), spielt dabei eine Reihe von cytoplasmatischen Aktin-Bündeln eine entscheidende Rolle bei der Positionierung der

Nährzellkerne. Diese Aktinbündel erstrecken sich von den Plasmamembranen in Richtung der Kerne und halten diese im Zentrum der Zelle, wodurch insbesondere ein Verstopfen der Ringkanäle durch die Zellkerne verhindert wird (Cant et al., 1994; Cooley et al., 1992; Guild et al., 1997; Mahajan-Miklos and Cooley, 1994a). In den letzten Jahren sind zwei hoch konservierte Proteinfamilien identifiziert worden, die so genannten KASH-Domänen-Proteine (Klarsicht/ANC-1/Syne homology) und die SUN-Domänen-Proteine (Sad1/UNC-84), die bei der direkten Verknüpfung der Kernhülle mit dem Cytoskelett zusammenwirken (Gruenbaum et al., 2005; Starr, 2007; Starr and Fischer, 2005; Wilhelmsen et al., 2006).

2.1.1 Die Rolle der KASH-Domänen-Proteine bei der Wanderung und Verankerung von Zellkernen.

Die Verknüpfung der KASH-Domänen-Proteine mit der Kernhülle erfolgt jeweils über die namensgebende, C terminale KASH-Domäne, die in der äußeren Kernmembran verankert wird. Die Familie der KASH-Domänen-Proteine lässt sich, abhängig von der Art der Cytoskelett-Elemente, mit denen eine Verknüpfung hergestellt wird, in drei Untergruppen aufteilen. Die erste Gruppe stellt eine Verknüpfung mit dem Aktin-Cytoskelett her und zeichnet sich durch zwei N-terminale Aktin-bindende Calponin-Homologie-Domänen (CH-Domänen (Korenbaum and Rivero, 2002)) aus, sowie eine große, Spektrin-artige stabförmige Domäne im Zentrum. Die entsprechenden Homologen in den verschiedenen Organismen heißen ANC-1 in *C. elegans* (nuclear anchorage defective) (Hedgecock and Thomson, 1982; Starr and Han, 2002; Starr and Han, 2003), Msp-300 (muscle specific protein) in *D. melanogaster* (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992; Zhang et al., 2002), Syne 1 und 2 (Synonyme: Nesprin 1 und 2, Myne 1 und 2, Enaptin oder NUANCE) in Vertebraten (Apel et al., 2000; Libotte et al., 2005; Mislow et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2001b; Zhang et al., 2007; Zhen et al., 2002). Mit Interaptin wurde außerdem ein mögliches Homolog in *Dictyostelium discoideum* identifiziert, obwohl in diesem Fall die KASH-Domäne nur eine sehr geringe Homologie zu den KASH-Domänen der anderen Organismen aufweist ((Rivero et al., 1998); Dissertation Huajiang Xiong). Die zweite Gruppe stellt einen Kontakt zum Mikrotubuli (MT)-Cytoskelett her, entweder durch direkte Interaktion mit MTs oder durch Bindung an Centrosomen (Reinsch and Gonczy, 1998). Die bisher identifizierten Homologen dieser Klasse heißen Zyg-12 (Malone et al., 2003) und Unc-83 (McGee et al., 2006; Starr et al., 2001) in *C. elegans* und Klarsicht (Klar, Synonym: Marbles) in *D. melanogaster* (Fischer-Vize and Mosley, 1994; Mosley-Bishop et al., 1999; Patterson et al., 2004; Welte, 2004). Die dritte Klasse kommt nur in Vertebraten vor und stellt über eine Interaktion mit Plectin einen Kontakt zu den Intermediärfilamenten her (Wiche, 1998), bisher wurde mit Nesprin-3 ein Vertreter dieser Gruppe beschrieben (Ketema et al., 2007; Wilhelmsen et al., 2005).

Die Funktion der Aktin-bindenden KASH-Domänen-Proteine bei der Verankerung von Zellkernen, ist besonders gut am Beispiel von *C. elegans* ANC-1 beschrieben worden (Hedgecock and Thomson, 1982; Starr and Han, 2002). Auch in Säugern konnte eine Beteiligung der Syne-Proteine an der Verankerung von Zellkernen am Aktin-Cytoskelett nachgewiesen werden (Grady et al., 2005), daneben sind jedoch auch Funktionen

beschrieben worden, die nichts mit der Kern-Positionierung zu tun haben, wie zum Beispiel eine Rolle bei der Architektur des Zellkerns (Libotte et al., 2005) oder bei der Morphologie des Golgi-Apparates (Beck, 2005; Gough and Beck, 2004; Gough et al., 2003).

Beide Syne-Proteine kommen als Folge von alternativem splicing und alternativer Transkriptions-Initiations- und Terminations-Signale in vielen verschiedenen Isoformen vor, wobei auch Varianten beschrieben worden sind, die entweder keine KASH-Domäne oder keine Aktin-bindende Domäne besitzen (Libotte et al., 2005; Padmakumar et al., 2004; Zhang et al., 2002).

2.1.2 *Drosophila* Msp-300

Auch der *Msp-300*-Locus in *Drosophila* ist sehr komplex und codiert mit hoher Wahrscheinlichkeit eine große Zahl verschiedener Isoformen (Zhang et al., 2001b), darunter vermutlich auch solche ohne eine KASH-Domäne, bzw. ohne N-terminale CH-Domänen. In flybase sind zurzeit drei Splice-Formen von *Msp-300* annotiert (Abb. 2.1.1.): *Msp-300-RB*, *Msp-300-RD* und *Msp-300-RE*. Die Annotationen in flybase beruhen hauptsächlich auf den verfügbaren Sequenzen partieller cDNAs, da es bisher so gut wie keine experimentellen Daten bezüglich der tatsächlich exprimierten Isoformen von *Msp-300* gibt. *Msp-300-RB* ist ein 24 kb-Transkript der 5'-Region des *Msp-300*-Locus und das resultierende Protein trägt nur die N-terminalen CH-Domänen und keine KASH-Domäne. *Msp-300-RE* (30 kb) wird durch den mittleren Bereich des Locus transkribiert und codiert ein Protein, welches weder die CH-Domänen noch die KASH-Domäne besitzt und zum größten Teil aus einem umfangreichen Exon besteht, das in den anderen Isoformen nicht vorkommt. Das 35 kb-Transkript *Msp-300-RD* codiert ein sehr großes Protein (11707 aa) mit einer Domänen-Struktur, die homolog zu den ANC-1/Syne Proteinen mit sowohl den N-terminalen CH-Domänen, als auch der C-terminalen KASH-Domäne ist.

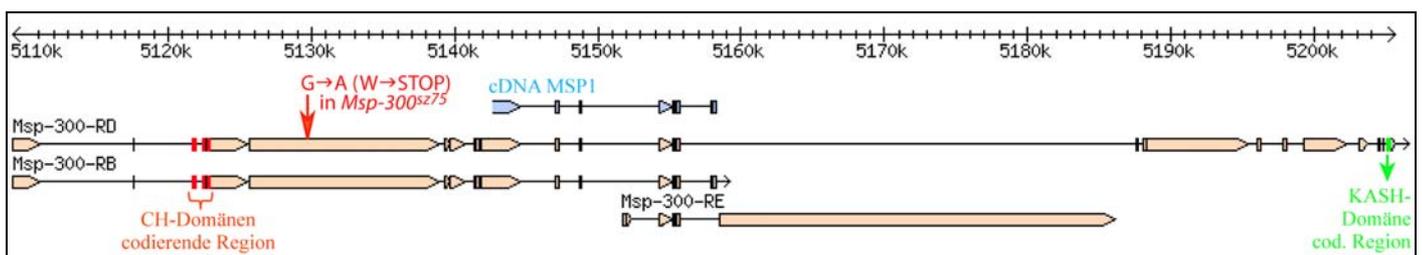


Abbildung 2.1.1. Schematische Darstellung des *Msp-300*-Locus. Gezeigt sind die drei in flybase annotierten Transkripte *Msp-300-RB*, *-RD* und *-RE*. Das Transkript *Msp-300-RD* enthält sowohl die CH-Domänen, als auch die KASH-Domänen codierende Region und codiert damit für ein zu ANC-1 und Syne-1 homologes Protein mit einer potentiellen Funktion bei der Verknüpfung des Aktin-Cytoskeletts mit dem Zellkern. Der rote Pfeil markiert die Position der Nonsense-Mutation im Allel *Msp-300^{sz75}*. In blau ist die cDNA *MSP1* eingezeichnet, die von Volk (Volk, 1992) zur Generierung des anti-Msp-300 Antikörpers verwendet wurde.

Die ersten Arbeiten an *Msp-300* befassten sich mit dessen Rolle bei der Muskelentwicklung, da das Protein in somatischen, visceralen und Herz-Muskelzellen hoch exprimiert wird (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992). Antikörperfärbungen zeigen, dass das Protein

in Muskel-Vorläuferzellen an Muskel-Muskel- und an Muskel-Ektoderm-Kontaktstellen (Apodemen) lokalisiert ist und später an Z-Scheiben der Muskelfibrillen akkumuliert (Volk, 1992). Inzwischen ist auch eine spezifische Lokalisation von *Msp-300* in direkter Nähe der Muskel-Zellkerne beschrieben worden (Montana and Littleton, 2006). *Msp-300*-mutante Fliegen zeigen einen Defekt während der Myogenese, wobei die beschriebenen Muskelphänotypen nur sehr schwach ausgeprägt sind. Das Protein hat eine Funktion bei der Extension der Myotuben in Richtung der Apodeme (Rosenberg-Hasson et al., 1996). Zum Zeitpunkt dieser frühen Arbeiten waren nur die CH-Domänen identifiziert und die Möglichkeit einer KASH-Domänen-Isoform wurde nicht berücksichtigt, so dass die Kernpositionierung während der Myogenese in *Msp-300*-Mutanten bisher nicht analysiert worden ist. Interessanterweise ist auch für die Syne-Proteine eine Rolle bei der Muskelentwicklung in Vertebraten beschrieben worden (Apel et al., 2000; Grady et al., 2005; Zhang et al., 2007).

2.1.3 *Drosophila* Klarsicht

KASH-Domänen-Proteine, die eine Verknüpfung zum Mikrotubuli Cytoskelett vermitteln, sind nur in *Drosophila* und *C. elegans* identifiziert worden, wobei die Homologen außerhalb der KASH-Domäne keine Ähnlichkeit auf Ebene der Aminosäuren-Sequenz aufweisen. Mutationen in *C. elegans* UNC-83 führen zu Defekten bei der Kernwanderung entlang von Mikrotubuli, wobei die Verknüpfung zum Centrosom oder Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) nicht beeinträchtigt wird, so dass in diesem Fall eine direkte Interaktion mit den Mikrotubuli vermutet worden ist (McGee et al., 2006; Starr et al., 2001; Sulston and Horvitz, 1981).

Auch für *C. elegans* Zyg-12, ein Mitglied der Hook-Protein-Familie (Walenta et al., 2001), ist unter anderem eine Rolle bei der Mikrotubuli-abhängigen Kern-Wanderung beschrieben worden, wobei in diesem Fall über eine direkte Interaktion mit Dynein eine Verknüpfung zum MTOC hergestellt wird (Malone et al., 2003).

Auch das *Drosophila* KASH-Domänen-Protein Klar stellt, durch eine Assoziation des N-Terminus mit Dynein, einen Kontakt mit dem MTOC her (Fischer et al., 2004). Klar spielt eine entscheidende Rolle bei der Kernwanderung während der Augenentwicklung (Fischer-Vize and Mosley, 1994; Mosley-Bishop et al., 1999; Patterson et al., 2004), außerdem kontrolliert es, durch die Regulierung der Aktivität von Motorproteinen, die Bewegung von Lipid-Vesikeln entlang von Mikrotubuli (Guo et al., 2005; Welte et al., 1998).

Ähnlich wie im Falle von *Msp-300* werden auch von *klar*, sowohl durch alternatives Spleißen als auch durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren, verschiedene Isoformen exprimiert, wobei auch Isoformen ohne KASH-Domäne beschrieben worden sind (Guo et al., 2005). Für eine der Isoformen mit KASH-Domäne ist eine Expression in den Nährzellen und der Oocyte nachgewiesen worden (Guo et al., 2005). Alle bisher beschriebenen *klar*-Allele sind homozygot lebensfähig und fertil. Allerdings führt ein kürzlich generiertes Deletions-Allel zu Sterilität bei homozygoten Weibchen (Michael Welte, persönliche Kommunikation).

2.1.4 Die Funktion von SUN-Domänen-Proteinen bei der Kernlokalisierung der KASH-Domänen-Proteine

Das erste Mitglied der evolutionär hoch konservierten Familie der SUN-Domänen-Proteine, UNC-84, wurde wiederum in *C. elegans* genauer untersucht. Der Name leitet sich von den beobachteten Problemen bei der Koordination von Bewegungen in *unc-84*-Mutanten her (**un**coordinated movement), die ebenfalls auf Defekte bei der Kernpositionierung zurückgehen (Horvitz and Sulston, 1980; Malone et al., 1999; Sulston and Horvitz, 1981). Die einzige konservierte Domäne in UNC-84 ist die C-terminale SUN-Domäne, deren Name sich von der deutlichen Homologie zum C-Terminus des *S. pombe*-Proteins Sad1 herleitet (**Sad1/UNC-84**-Domäne) (Hagan and Yanagida, 1995; Lee et al., 2002; Malone et al., 1999). SUN-Domänen-Proteine sind inzwischen in den meisten Organismen identifiziert worden, darunter ein weiteres in *C. elegans* (Sun-1, auch *matefin* oder MTF-1 (Fridkin et al., 2004)), vier in Säugern (Sun1-3 und SPAG (Dreger et al., 2001; Hasan et al., 2006; Hodzic et al., 2004; Padmakumar et al., 2005)), sowie zwei in *Dictyostelium discoideum* (*Dd* Sun-1 und -2; Dissertation Huajiang Xiong). Auch in *Drosophila* finden sich mit CG18584 und CG6589 zwei putative Proteine mit einer SUN-Domäne. Fast alle bisher untersuchten SUN-Domänen-Proteine lokalisieren an der inneren Kernmembran. Eine Ausnahme stellen die SUN-Domänen-Proteine SUN3 und SPAG4 in Säugern dar, welche vorwiegend an den ER-Membranen detektiert worden sind (Crisp et al., 2006; Hasan et al., 2006).

In den meisten Organismen haben SUN-Domänen-Proteine eine entscheidende Funktion bei der Rekrutierung der KASH-Domänen-Proteine zur Kernhülle (Starr and Fischer, 2005; Wilhelmsen et al., 2006). Das ist erstmals für das *C. elegans* Protein UNC-84 gezeigt worden, welches sowohl mit ANC-1, als auch mit UNC-83 interagiert und jeweils für die Lokalisation dieser Proteine in der Kernhülle benötigt wird (Lee et al., 2002; Starr and Han, 2002; Starr et al., 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der SUN-Domäne, die zu einer Mislokalisierung der KASH-Domänen-Proteine führen, die Lokalisation von *Unc-84* selbst nicht verändern (Lee et al., 2002; Malone et al., 1999; Starr and Han, 2002; Starr et al., 2001). Das zweite in *C. elegans* identifizierte SUN-Domänen-Protein, SUN-1, ist essentiell für die korrekte Lokalisation und Funktion von ZYG-12 (Fridkin et al., 2004; Malone et al., 2003). Auch für Sun-1 und Sun-2 in Säugern konnte eine Funktion bei der Kernpositionierung durch die Rekrutierung der verschiedenen KASH-Domänen-Proteine nachgewiesen werden (Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006; Padmakumar et al., 2005; Wilhelmsen et al., 2005). Im Gegensatz dazu konkurrieren im Falle von *Dictyostelium discoideum* das putative KASH-Homolog Interaptin und das SUN-Homolog Sun-1 bei der Kernmembran-Lokalisation um dieselben Bindestellen (Dissertation Huajiang Xiong). Wie bereits erwähnt, zeigt auch die Membran-bindende Domäne von Interaptin nur eine sehr geringe Homologie zu allen anderen KASH-Domänen, so dass es sich möglicherweise bei Interaptin nicht um ein wirkliches Ortholog handelt.

Neben der in den meisten Fällen beobachteten Rolle der SUN-Domänen-Proteine bei der Kernpositionierung, sind auch andere Funktionen beschrieben worden, wie zum Beispiel die Regulation der Kern-Form (*Dictyostelium* Sun-1; Dissertation Huajiang Xiong) oder eine Involvierung in Prozesse wie Fett-Metabolismus, Keimzell-Proliferation und Telomer-Clustering (Fridkin et al., 2004; Greer and Brunet, 2005; Niwa et al., 2000).

Insgesamt deutet die in vielen Organismen beobachtete Interaktion von SUN- und KASH-Domänen-Proteinen jedoch auf konservierte Mechanismen bei der Kernverankerung und der Kernwanderung hin. Die Abbildung 2.1.1. zeigt eine Zusammenfassung der analysierten Funktionen verschiedener KASH- und SUN-Domänen-Proteine, bei denen die KASH-vermittelte Verknüpfung mit der Kernmembran eine Rolle spielt.

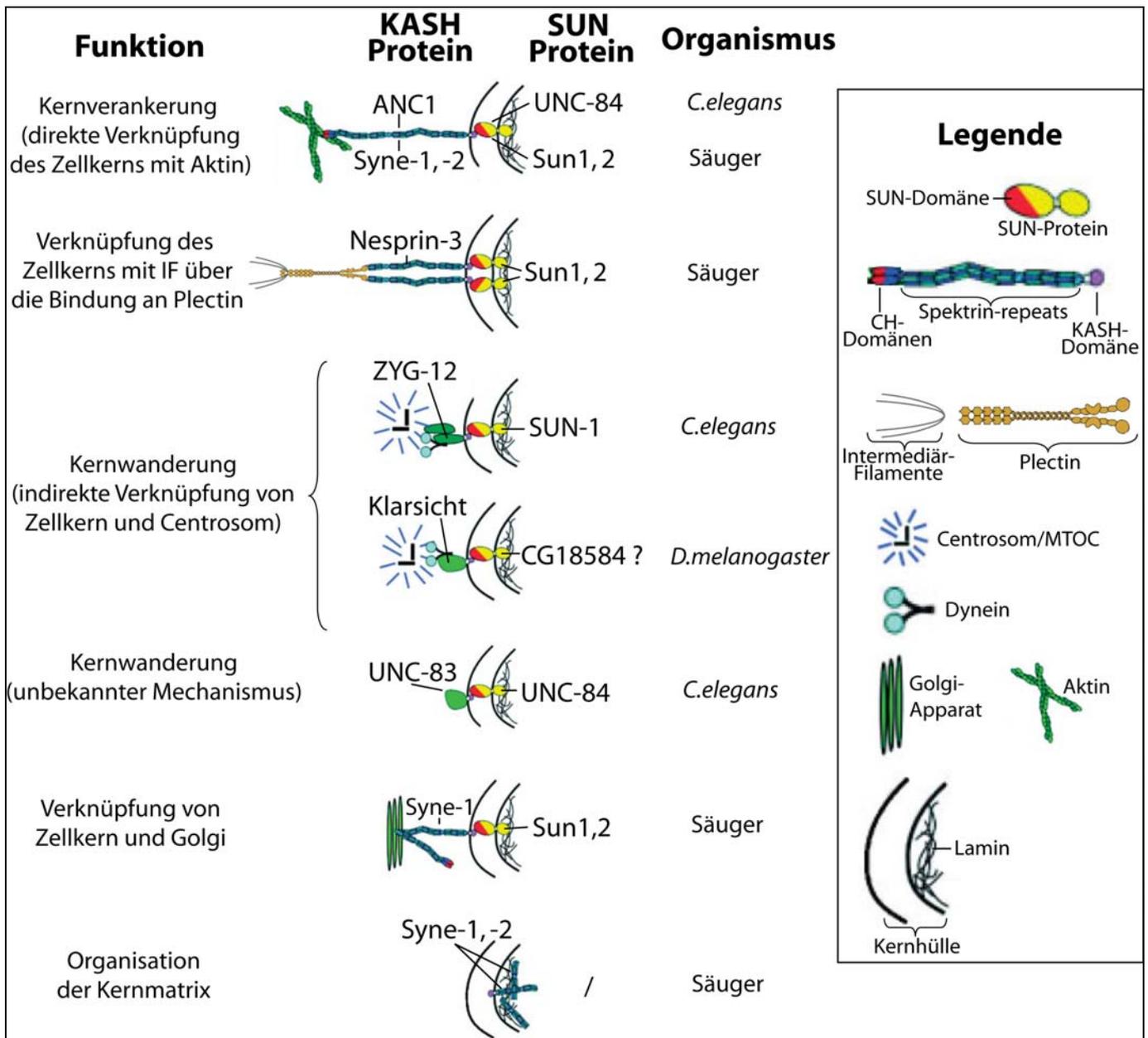


Abbildung 2.1.1. Modelle für die am besten untersuchten Funktionen von KASH- und SUN-Domänen-Proteinen verschiedener Organismen.

2.1.5 Ziele der Arbeit (2)

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, eine mögliche Funktion der KASH-Domänen-Proteine Msp-300 und Klarsicht, sowie des SUN-Domänen-Proteins CG18584, bei der Kernpositionierung während der Oogenese von *Drosophila* zu untersuchen. Dazu sollte, durch die Generierung von Deletions-Allelen, der Funktionsverlust von Msp-300 und CG18584 analysiert werden. Insbesondere haben wir außerdem untersucht, ob die in anderen Organismen beobachtete Interaktion zwischen SUN- und KASH-Domänen-Proteinen in *Drosophila* konserviert ist und ob Msp-300 und Klarsicht redundante Funktionen haben.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Die Expression von Msp-300 und Klarsicht während der Oogenese

Ein polyclonaler Antikörper gegen den mittleren Bereich des Msp-300-Proteins (codiert durch die cDNA MSP1, siehe Einleitung, Abb. 2.1.1.; Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992), wurde von uns verwendet, um die Lokalisation von Msp-300 in *Drosophila*-Eikammern zu analysieren. Die Antikörperfärbungen zeigen, dass Msp-300 während aller Oogenese-Stadien exprimiert wird (Abb. 2.2.1. A-D) und bereits während sehr früher Stadien insbesondere in der Oocyte konzentriert ist (Abb. 2.2.1. A). Sowohl in der Oocyte, als auch in den Nährzellen akkumuliert Msp-300 am Aktinkortex und insbesondere an der Membran der Zellkerne, wobei das Kernplasma frei von Protein ist (Abb. 2.2.1. C, D). Vor allem in der Oocyte liegt eine große Menge des Proteins auch im Cytoplasma vor (Abb. 2.2.1. A, B). Im Gegensatz zu den Keimzellen zeigen die Follikelzellen nur eine sehr schwache Färbung. Dabei akkumuliert das Protein in der Nähe der Follikel-Zellkerne in einem punktförmigen Muster (Abb. 2.2.1 C', Pfeilspitzen). Auch in den Follikelzellen ist speziell im Kernplasma kein Protein nachzuweisen (Abb. 2.2.1 C). Ähnliche Resultate bezüglich der Lokalisation von Msp-300 in Ovarien sind inzwischen auch für Färbungen mit einem polyklonalen Antikörper beschrieben worden, der gegen den C-terminalen Bereich des Proteins, inklusive der KASH-Domäne, generiert wurde (Yu et al., 2006).

Für Klarsicht ist bereits gezeigt worden, dass es während der Oogenese exprimiert wird und dass es, in Abhängigkeit von der KASH-Domäne, an der Kernhülle der Nährzellen, der Oocyte und der Follikelzellen akkumuliert ((Guo et al., 2005) und Abb. 2.2.1. E-F). Der direkte Vergleich der Protein-Verteilung von Klar und Msp-300 verdeutlicht gewisse Unterschiede. Klar zeigt keine spezifische Anreicherung in der Oocyte und nur eine sehr schwache Färbung im Cytoplasma (Abb. 2.2.1 E). Außerdem wird Klar auch in den Follikelzellen stark exprimiert und zeigt dabei die gleiche uniforme Lokalisation rund um die Zellkerne, wie in den Nährzellen und der Oocyte, im Gegensatz zur der punktförmigen Akkumulation im Falle von Msp-300 (Abb. 2.2.1 C' u. F').

Die in den Antikörperfärbungen beobachtete Verteilung der Proteine lässt auf eine mögliche Funktion von Msp-300 und Klar in der Oogenese schließen. Insbesondere liegt dabei die Vermutung nahe, dass diese Funktion in irgendeiner Weise mit der Kernhülle zusammenhängt.

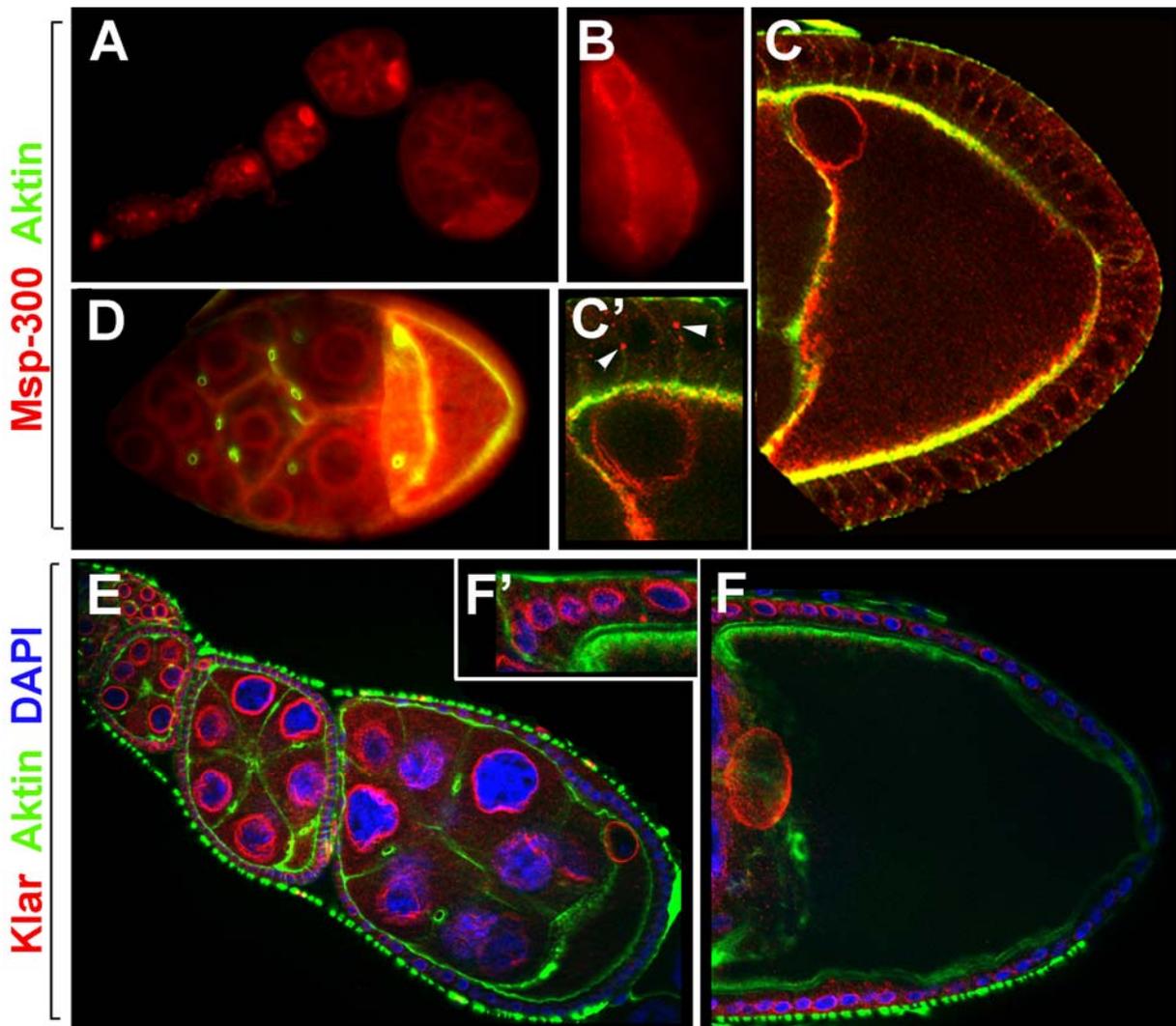


Abbildung 2.2.1.: Lokalisation von Msp-300 und Klarsicht in *Drosophila*-Eikammern. (A-D) anti-Msp-300 Antikörperfärbungen (rot). (C, D) Co-Färbung des Aktin-Cytoskeletts (FITC-Phalloidin, grün), (C, C') konfokale Bilder. (A) Msp-300-Lokalisation im Germarium (links unten) und in Eikammern (Stadien 1-7). Die Anreicherung von Msp-300 markiert die Oocyte bereits im Germarium und bleibt während späterer Stadien im Cytoplasma der Oocyte erhalten. Die Färbung ist in den Nährzellen schwächer und nur ganz blass in den Follikelzellen. Das Protein akkumuliert in Nährzellen und in der Oocyte an der Kernhülle. (B) Eikammer, frühes Stadium 9, (C) Eikammer, Stadium 10A. Msp-300 akkumuliert an der Kernhülle der Oocyte während das Kernplasma frei von Protein ist. In Follikelzellen akkumuliert Msp-300 in punktförmigen Strukturen nahe der Follikelzellkerne (C', Pfeile). (E-F) Anti-Klar Antikörper (rot), F-Aktin (FITC-Phalloidin, grün) und DNA (DAPI, blau) Färbungen. (E) Eikammern zunehmend älterer Stadien (links oben: Stadium 3, rechts unten: Stadium 9). (F) Dorsalansicht einer Stadium 10B Eikammer. Klarsicht ist von frühen Oogenese-Stadien an sichtbar und akkumuliert in Nährzellen, in der Oocyte und in den Follikelzellen (F') an der Kernhülle.

2.2.2 Die KASH-Domäne von Msp-300 lokalisiert an der Kernmembran

Für die Msp-300-Homologe von *C.elegans* und Säugern ist gezeigt worden, dass die KASH-Domäne für die Lokalisation an der Kernhülle ausreichend ist (Grady et al., 2005; Starr and Han, 2002; Zhang et al., 2001b). Um zu untersuchen, ob das auch für die KASH-Domäne von Msp-300 zutrifft, haben wir ein KASH-Domänen-GFP-Fusionsprotein in den pUASp-Vektor kloniert. Unter Verwendung der *tub-Gal4-VP16*-Treiberlinie haben wir mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems (Brand and Dormand, 1995; Rorth, 1998) dieses Konstrukt in der

Keimbahn überexprimiert und die Expression durch anti-GFP Antikörperfärbung analysiert (die Beobachtung des GFP-Signals an lebendem Material erbrachte identische Ergebnisse). In der Tat konnten wir eine deutliche Akkumulation an der Kernhülle der Nährzellen (Abb. 2.2.2. A, B) und, etwas schwächer ausgeprägt, an der Kernhülle der Oocyte (Abb. 2.2.2. C) beobachten. Während das Kernplasma jeweils vollkommen frei war, trat das KASH-GFP-Konstrukt vor allem in den Nährzellen auch im Cytoplasma auf, wobei es dort vorwiegend filamentöse Aggregate bildete (Abb. 2.2.2. A, B). In der Oocyte war die Konzentration im Cytoplasma deutlich geringer, dabei zeigten konfokale Schnitte, dass das Fusionsprotein dort vor allem in der Nähe des Zellkortex akkumulierte (vergleiche unterschiedliche konfokale Schnittebenen in Abb. 2.2.2. D₁ und D₂).

Die in den Färbungen beobachtete Akkumulation um die Zellkerne zeigt, dass auch die KASH-Domäne von *Drosophila* Msp-300 für die Lokalisation des Proteins an der Kernhülle ausreicht und deutet darauf hin, dass die in Antikörperfärbungen beobachtete Lokalisation des Proteins an der Kernhülle sehr wahrscheinlich auf eine von dem verwendeten Antikörper detektierte KASH-Domänen-Isoform von Msp-300 zurückzuführen ist.

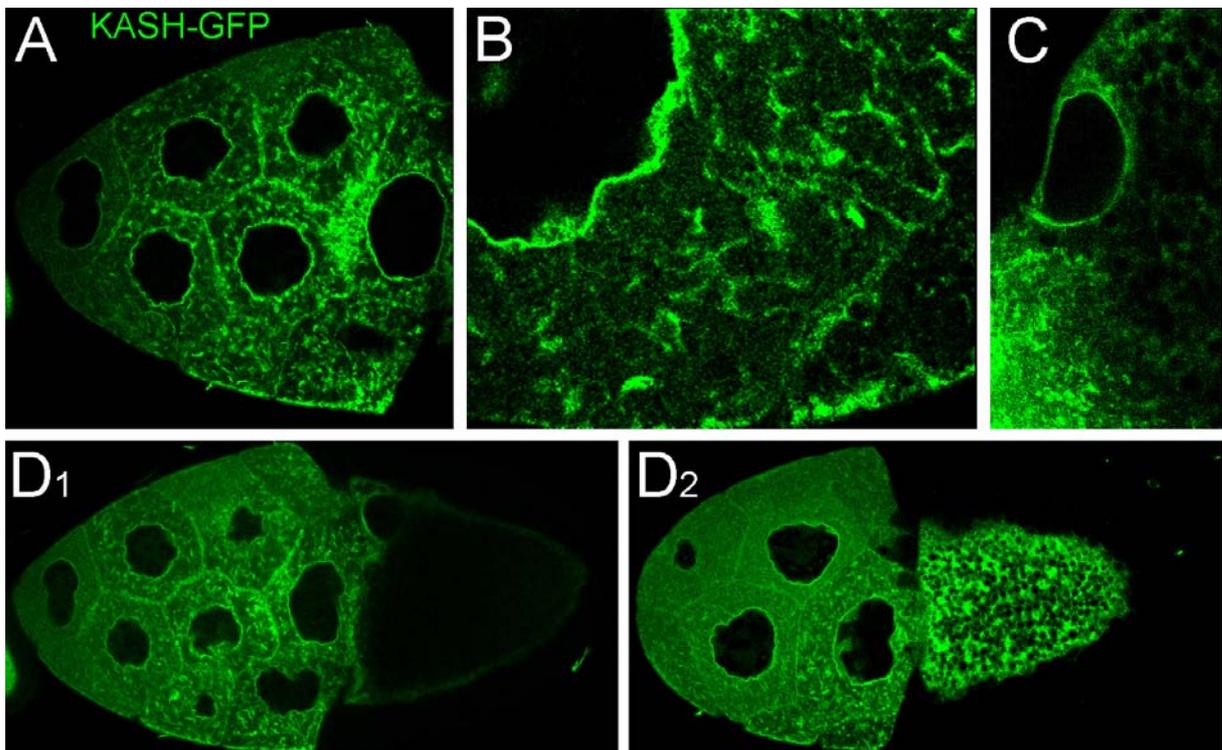


Abbildung 2.2.2.: Lokalisation eines GFP-Msp-300-KASH-Domänen-Fusionsproteins in den Nährzellen und der Oocyte von Stadium 10B-Eikammern. Eine *pUASp-GFP-KASH*-Linie wurde mit einer Keimbahn spezifischen *tub-Gal4-VP16*-Treiberlinie kombiniert. (A-D) anti-GFP Antikörperfärbungen. Das GFP-KASH-Konstrukt ist in Nährzellen (A, B) und in geringerer Menge in der Oocyte (C, D) im Cytoplasma lokalisiert. Es akkumuliert jeweils an der Kernhülle und ist vom Kernplasma ausgeschlossen. (B) Im Cytoplasma liegt das Fusionsprotein zum Teil in Form von filamentösen Aggregaten vor. (D) Konfokale Schnitte durch das Zentrum der Eikammer (D₁) und nahe des Oocyt-Kortex (D₂) zeigen, dass das Konstrukt in der Oocyte nahe des Kortex akkumuliert.

In Säuger-Gewebekultur und bei Mäusen, sowie in *C. elegans*, führt die Überexpression eines GFP-KASH-Domänen-Fusionsproteins, zu starken dominant-negativ mutanten

Phänotypen (Grady et al., 2005; Libotte et al., 2005; Starr and Han, 2002; Zhen et al., 2002). Überraschenderweise konnten wir als Folge der Überexpression unseres GFP-KASH-Konstrukts keine dominant negativen Effekte während der Oogenese beobachten. Ähnliche Resultate wie die oben beschriebenen, sowohl in Bezug auf die beobachtete Lokalisation in den Keimbahn-Zellen, als auch in Bezug auf das Fehlen irgendwelcher dominant negativen Phänotypen, wurden inzwischen auch bei der Keimbahn-spezifischen Überexpression eines anderen *Msp-300*-KASH-Domänen-GFP-Fusionsproteins gemacht (Yu et al., 2006).

Wir haben auch ein GFP-Fusionskonstrukt für die beiden Calponin-Homologie-(CH) Domänen des *Msp-300*-Locus kloniert. Diese GFP-CH-Konstrukt zeigte jedoch, sowohl bei der direkt durch einen maternalen *tubulin*-Promotor getriebenen Expression (*mtub*-GFP-CH), als auch bei Aktivierung eines *pUASp*-GFP-CH Konstrukts durch verschiedene Keimbahn-spezifische Treiberlinien (*nos-Gal4 VP16*, *tub-Gal4 VP16*), lediglich eine uniforme Verteilung in allen Keimzellen und keine spezifische intrazelluläre Lokalisation. Außerdem wurden auch für dieses Konstrukt keinerlei phänotypische Auswirkungen als Folge der Überexpression beobachtet.

2.2.3 Keimbahnklone des Allels *Msp-300^{sz75}* führen zu einem Defekt des Nährzell-Dumpings

Es ist beschrieben worden, dass die EMS-induzierte Mutante *jf22^{sz75}* (*Msp-300^{sz75}* (Szidonya and Reuter, 1988)) eine Mutation im *Msp-300*-Locus trägt, da der oben beschriebene und verwendete anti-*Msp-300*-Antikörper sowohl in homozygot mutanten Embryonen, als auch in Western-Blots kein Protein detektiert (Rosenberg-Hasson et al., 1996). Auch in *Msp-300^{sz75}*-mutanten Eikammern lässt sich das *Msp-300*-Protein weder mit dem von uns verwendeten Antikörper, noch mit dem oben erwähnten alternativen Antikörper gegen die KASH-Domäne nachweisen (Abb. 2.2.5. und Yu et al., 2006). *Msp-300^{sz75}*-homozygote Embryos zeigen einen Muskelphänotyp, der jedoch in Embryonen, die transheterozygot für eine den gesamten *Msp-300*-Locus umfassende Deletion sind, stärker ausgeprägt ist (Rosenberg-Hasson et al., 1996). Das deutet darauf hin, dass das *Msp-300^{sz75}*-Allel kein Nullallel ist.

Um die molekulare Natur des *Msp-300^{sz75}*-Allels zu identifizieren, haben wir genomische DNA aus *Msp-300^{sz75}*-homozygoten Fliegen isoliert (*Msp-300^{sz75} FRT40A / Msp-300^{sz75}* Fliegen sind semiletal, s.u.) und den gesamten *Msp-300*-Locus sequenziert. Dabei konnten wir eine Nonsense-Mutation im sechsten Exon der annotierten *Msp-300*-Transkripte *Msp-300-RB* und *Msp-300-RD* identifizieren (G/C zu A/T Transition in Codon 2163, s. Einleitung, Abb. 2.1.1.). Dieselbe Nonsense-Mutation ist inzwischen unabhängig auch von einer anderen Gruppe beschrieben worden (Yu et al., 2006). Diese Mutation verkürzt die annotierte Syne-homologe Isoform von *Msp-300* (*Msp-300-PD*) um mehr als zwei Drittel. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass es bisher keine experimentellen Daten zu den tatsächlich in *Drosophila* exprimierten *Msp-300*-Isoformen gibt.

Es ist gezeigt worden, dass Keimbahnklone für das *Msp-300^{sz75}*-Allel zu einem Dumping-Phänotyp führen (Yu et al., 2006). Ein solcher Phänotyp wird hervorgerufen, wenn der Prozess des Nährzell-Dumpings defekt ist, also der Transfer des gesamten Nährzell-

Cytoplasmas in die Oocyte während des Stadiums 10B der Oogenese (Cant et al., 1994; Cooley and Theurkauf, 1994; Cooley et al., 1992). Auch wir konnten den beschriebenen Dumping-Phänotyp in *Msp-300^{sz75}*-mutanten Eikammern beobachten, indem wir nach Rekombination des *Msp-300^{sz75}*-Allels auf ein *FRT40A*-Chromosom mit Hilfe des FLP-DFS Systems (Chou and Perrimon, 1992) Keimbahnklone induziert haben (Abb. 2.2.3.). Im Zuge der Generierung des *Msp-300^{sz75} FRT40A*-Chromosoms konnten wir außerdem feststellen, dass die Letalität des ursprünglichen *Msp-300^{sz75}*-Chromosoms durch eine sekundäre Mutation verursacht wird. Das Auftreten eines beachtlichen Anteils lebensfähiger *Msp-300^{sz75} FRT40A / Msp-300^{sz75}*-Fliegen (30% der erwarteten Genotypen überleben), in denen sich kein Msp-300-Protein mittels Antikörperfärbung nachweisen lässt, zeigt, dass das Allel *Msp-300^{sz75}* semiletal ist.

Der Oogenese Phänotyp war in *Msp-300^{sz75}*-homozygoten Weibchen, in denen sowohl die Keimbahn als auch die somatischen Follikelzellen mutant für *Msp-300^{sz75}* sind, identisch mit dem nur *Msp-300^{sz75}*-homozygote Keimbahnklone tragender Weibchen. Diese Übereinstimmung der Phänotypen zeigt, dass *Msp-300^{sz75}* keinen Defekt in den somatischen Follikelzellen hervorruft. Auch in *Msp-300^{sz75}*-homozygoten Follikelzellklonen konnten wir, im Gegensatz zu den von Yu et al. (Yu et al., 2006) beschriebenen subtilen Defekten, keinerlei Veränderung in der Lokalisation oder Morphologie der Follikelzellkerne beobachten (nicht gezeigte Daten).

Weibchen mit *MSP-300^{sz75}*-Keimbahnklonen und *MSP-300^{sz75}*-homozygote Weibchen legen weniger Eier als wildtypische Fliegen, und die abgelegten Eier sind im Durchschnitt deutlich kleiner (um etwa 60%) und haben deformierte dorsale Anhänge (Abb. 2.2.2.B). Die Tatsache, dass keine ventralisierten Eier abgelegt werden, zeigt, dass die Wanderung oder Verankerung des Oocytenkerns nicht beeinträchtigt ist. (Bereits geringfügige Defekte in der Oocytenkern-Positionierung führen zu stark ventralisierten Eiern (Brendza et al., 2002; Duncan and Warrior, 2002; Januschke et al., 2002; Swan et al., 1999)).

Die Färbung von *Msp-300^{sz75}*-mutanten Eikammern mit anti-Lamin Antikörpern zur Visualisierung der Kernhülle und mit Phalloidin zur Markierung von F-Aktin zeigte, in Eikammern ab Stadium 10B, Defekte innerhalb des Nährzellclusters. Die Plasmamembranen der Nährzellen brechen teilweise auseinander und die Nährzellkerne sind häufig nicht wie beim Wildtyp im Zentrum der Zellen lokalisiert, sondern wandern in benachbarte Nährzellen oder in die Oocyte ein (Abb. 2.2.3. D-F). Die cytoplasmatischen Aktinbündel in den Nährzellen werden jedoch normal ausgebildet, solange die Membran der Zelle vollständig intakt ist (Abb. 2.2.3. G, I). Der Oocytenkern ist häufig auch in deutlich defekten Eikammern am anterioren Kortex lokalisiert (Abb. 2.2.3.F, markiert durch den Stern). Nur in seltenen Fällen beobachteten wir eine Fehlpositionierung des Oocytenkerns, die jedoch vermutlich auf einen indirekten Effekt zurückzuführen ist. Wir gehen davon aus, dass der Oocytenkern durch mechanische Kräfte, verursacht durch aus den kollabierten Nährzellen in die Oocyte eindringendes Cytoplasma und Zellkerne, verdrängt wird. In früheren Stadien ist der Oocytenkern immer an der anterior kortikalen Position lokalisiert. Wie bereits erwähnt, deutet auch die normale dorsoventrale Polarität der abgelegten Eier, auf eine fehlerfreie Positionierung des Oocytenkerns hin.

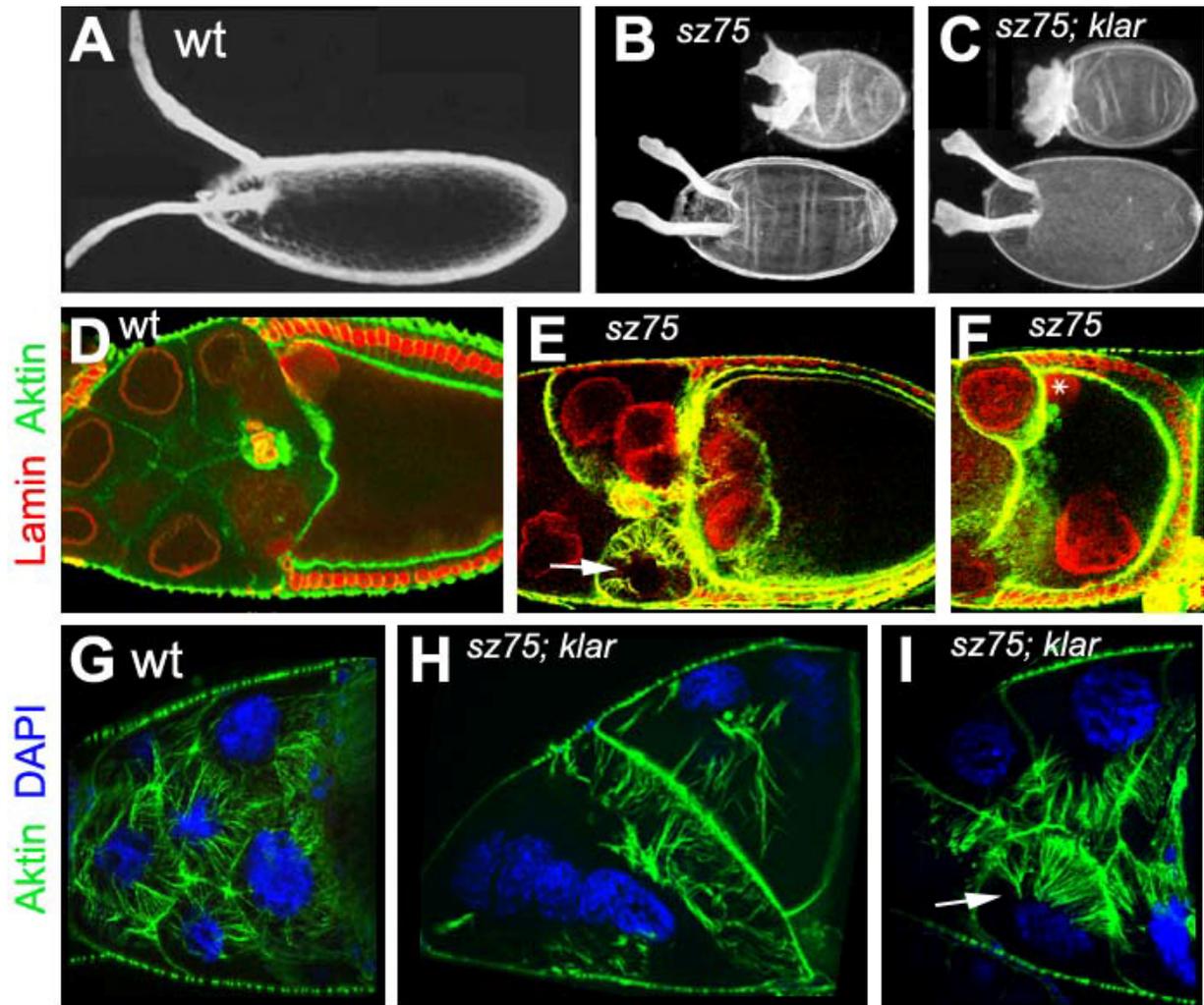


Abbildung 2.2.3.: Ei- und Eikammer-Phänotypen als Folge $Msp-300^{sz75}$ - und $Msp-300^{sz75}; klar^{BX12}$ - mutanter Ovarien. (A) Wildtyp-Ei, (B) Eier resultierend aus $Msp-300^{sz75}$ -Keimbahnklonen. Die Eier sind deutlich kleiner als wildtypische Eier und tragen fehlgebildete dorsale Anhänge, charakteristisch für Defekte des Nährzell-Dumping. (C) Eier resultierend aus $Msp-300^{sz75}$ -Keimbahnklonen induziert in $klar^{BX12}$ -homozygoten Weibchen. Der Phänotyp der Eier von $Msp-300^{sz75}$ -mutanten Weibchen wird im $klar^{BX12}$ -mutanten Hintergrund nicht verstärkt. (D-K) Die Architektur von $Msp-300^{sz75}$ und $Msp-300^{sz75}; klar^{BX12}$ -doppelt mutanten Eikammern zeigt identische Defekte. Aktin in grün (FITC Phalloidin), DNA in blau (DAPI, G-I), Kernmembranen in rot (anti-Lamin, D-E). (D, G) Wildtyp-Eikammern (E, F) $Msp-300^{sz75}$ -mutante Eikammern, (H, I) $Msp-300^{sz75}; klar^{BX12}$ -doppelt mutante Eikammern. (E) Fehlpositionierte Nährzellkerne, zusammengedrängt an der Nährzell-Oocyten Grenze. Der Pfeil weist auf eine Nährzelle mit intaktem Zell-Kortex und normalen cytoplasmatischen Aktin-Bündeln hin. (F) An der korrekten anterior kortikalen Position lokalisierter Oocytenkern (Stern), in die Oocyte eindringende Nährzellkerne sind posterior des Oocytenkerns lokalisiert. (H) Auseinander gebrochene Nährzellmembranen und zusammengedrängte Nährzellkerne. (I) Nährzellen mit defekten Zellkortex und Aktinbündeln in direkter Nähe einer Nährzelle mit intaktem Zellkortex und wildtypischen Aktinbündeln (Pfeil).

In jüngster Zeit ist beobachtet worden, dass die Überexpression einer bestimmten Klar-Isoform (δ -Klar) in der Keimbahn zu einer Misslokalisierung des Oocytenkerns in Eikammern später Stadien (nach Stadium 11) führt. Die anfängliche Wanderung des Kerns ist dabei jedoch nicht beeinträchtigt (Poster-Präsentation fly meeting San Diego 2007, Cotton et al.). Klar- δ Nullallele zeigen hingegen keinen Phänotyp. Da Klar das einzige in *Drosophila*

identifizierte KASH-Domänen-Protein neben *Msp-300* ist, und genau wie *Msp-300* in den Nährzellen und der Oocyte an der Kernhülle lokalisiert, haben wir untersucht, ob *Msp-300*; *klar* doppelt mutante Eikammern einen zusätzlichen oder stärkeren Phänotyp zeigen. Das Allel *klar^{BX12}* führt zu einer Deletion der KASH-Domäne und zu einem vollständigen Verlust der Oogenese-spezifischen Klar Isoformen (Guo et al., 2005), wie die meisten *klar*-Allele ist aber auch dieses Allel lebensfähig und fertil. Die Induktion von *Msp-300^{sz75}*-Keimbahnklonen in einem *klar^{BX12}*-homozygoten Hintergrund führt zu keiner erkennbaren Verstärkung oder Veränderung des *Msp-300^{sz75}*-Phänotyps (Abb. 2.2.3.). Sowohl die Eiphänotypen (Abb. 2.2.2. B, C), als auch die beschriebenen Defekte der Eikammern waren bei einfach- und doppelt-mutanten Weibchen identisch (vergleiche Abb. 2.2.3. E, F und H, I). Um die Phänotypen der Einzel- und der Doppeltmutanten statistisch auszuwerten, haben wir jeweils die Länge der abgelegten Eier gemessen. Während wildtypische Eier im Durchschnitt 0,6 mm lang und nie kürzer als 0,56 mm sind, haben wir die Eier der mutanten und der doppelt mutanten Weibchen in drei Größenklassen eingeteilt: wildtypisch (0,5mm-0,6mm), mittelgroß (0,4mm-0,5 mm) und klein ($\leq 0,4$ mm). Die *Msp-300*-mutanten Weibchen legten 28% wildtypische, 47% mittelgroße und 25% kleine Eier (n=111). Die Gelege doppelt mutanter Weibchen zeigten eine vergleichbare Größenverteilung (34% wildtypische, 46% mittelgroße, 20% kleine Eier, n=103).

2.2.4 Generierung molekular definierter Deletionen des *Msp-300*-Locus

Wie oben beschrieben, handelt es sich bei dem einzigen, bisher verfügbaren Allel *Msp-300^{sz75}* nicht um eine Nullmutation. Um eine Funktionsverlust-Mutante von *Msp-300* zu generieren, haben wir eine molekular definierte Deletion des gesamten Locus erzeugt, indem wir Fliegenstämme der *Exelixis Drosophila* Stock Collection verwendeten (Thibault et al., 2004). Dabei handelt es sich um P-Element- oder piggyBack-Insertions-Stämme, die FRT-Stellen (flipase recombination targets) tragen. Wenn zwei solcher Stämme mit FRT-Stellen in geeigneter Orientierung und Lage in *trans* zueinander gebracht werden, kann es es durch Hitzeschock-induzierte Expression des Enzyms Flipase zur Rekombination zwischen den FRT-Stellen kommen (Parks et al., 2004). Als Folge davon wird der genomische Bereich zwischen den beiden FRTs deletiert. Genauere Informationen zur Herstellung der *Msp-300*-Deletionen sind unter Material und Methoden zu finden.

Insgesamt wurden drei *Msp-300*-Deletionen von uns generiert, deren genaue Lage in der Abbildung 2.2.4. schematisch dargestellt ist: Eine ca. 101 kb große Deletion des gesamten Locus (*Df(2L)Msp-300-compl*, Abb. 2.2.4. D), eine 37,7 kb große Teildeletion (24,9 kb des transkribierten Bereichs), die den N-terminalen Bereich des Proteins inklusive der Aktin-bindenden Calponin-Homologie-Domänen betrifft (*Df(2L)Msp-300-5'*, Abb. 2.2.4. B), und eine ca. 63,3 kb große Teildeletion (61,1 kb des transkribierten Bereichs), die den C-terminalen Bereich inklusive der KASH-Domäne betrifft (*Df(2L)Msp-300-3'*, Abb. 2.2.4. C). In der Abbildung ist zu erkennen, dass im Falle der Deletionen *Df(2L)Msp-300-compl* und *Df(2L)Msp-300-3'* zusätzlich das downstream von *Msp-300* gelegene Gen *Cyp28d2* vollständig deletiert ist. Dieses Gen codiert für ein Protein der Cytochrom P450 (CYP)

Superfamilie, von denen es 90 Mitglieder in *Drosophila* gibt und bei denen es sich um Stoffwechsel-Enzyme handelt, die eine Rolle bei der Synthese von Steroidhormonen und Vitaminen, sowie (unter anderem im Fall der Cyp28-Unterfamilie) beim Abbau von Fremdstoffen spielen (Danielson et al., 1997; Tijet et al., 2001). Spezifische Auswirkungen auf Entwicklungsprozesse als Folge der Deletion dieses Gens sind sehr unwahrscheinlich.

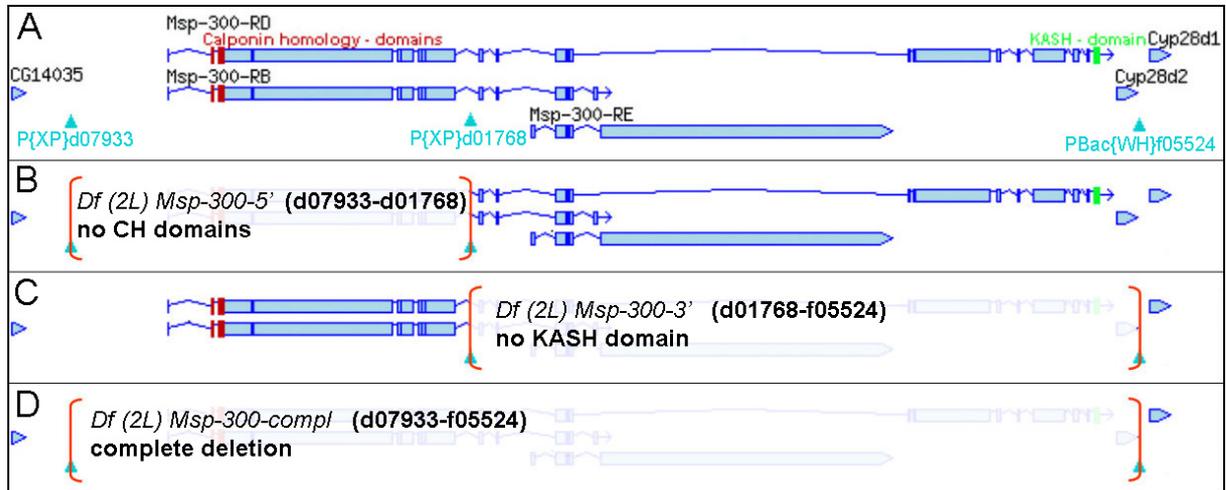


Abbildung 2.2.4.: Mit Hilfe von Exelixis-Insertionen generierte Deletionen des *Msp-300*-Locus.

(A) Darstellung des *Msp-300*-Locus mittels GBrowse. Gezeigt sind die drei aktuell annotierten *Msp-300* Splice-Varianten, sowie ein Teil des upstream gelegenen Gens *CG14035* und die beiden downstream gelegenen Gene *Cyp28d1* und *Cyp28d2*. Außerdem ist die Lage der von uns verwendeten Exelixis-Insertionen durch Pfeilspitzen markiert (türkis). (B-C) Lage der unterschiedlichen Deletionen. Der transparente Bereich zwischen den roten Klammern ist jeweils deletiert. (B) Deletion des 5' Teils von *Msp-300* (*Df(2L)Msp-300-5'*), inklusive der CH-Domänen codierenden Region. (C) Deletion des 3' Teils von *Msp-300* (*Df(2L)Msp-300-3'*), inklusive der KASH-Domäne codierenden Region. (D) Deletion des gesamten *Msp-300*-Locus (*Df(2L)Msp-300-compl*). Im Fall von *Df(2L)Msp-300-5'* und *Df(2L)Msp-300-compl* ist jeweils auch das Gen *Cyp28d2* vollständig deletiert (C,D).

Die Deletionen *Df(2L)Msp-300-compl* und *Df(2L)Msp-300-5'* sind letal, die Deletion *Df(2L)Msp-300-3'* ist semiletal (ca. 5% homozygote Überlebende).

Die statistische Auswertung der Eigelege der *Msp-300*-Deletions-Stämme ergab, dass die Letalität jeweils während der Larvenentwicklung auftritt (s. Tab. 2.1.). Im Falle der semiletalen Deletion *Df(2L)Msp-300-3'* stirbt außerdem ein deutlicher Teil der überlebenden Larven (<8%) nach der Verpuppung. Bezüglich der in Tabelle 2.1 aufgeführten Resultate der statistischen Auswertung, ist bei der reduzierten Anzahl der Puppen, welche die larvale Letalität anzeigt, zu beachten, dass eine Reduktion um 25% aus dem Vorhandensein des CyO-Balancers resultiert, der in Homozygotie ebenfalls zu larvaler Letalität führt. Die im Falle der letalen Deletionen beobachtete Verpuppungsrate von ungefähr 50% zeigt jeweils an, dass die Letalität während der Larvalentwicklung auftritt.

	Eier gesamt	befruchtete Eier	geschlüpfte Larven		Puppen		Adulte		homozygote Adulte	
			Anzahl	Anteil bzgl. befr. Eier	Anzahl	Anteil bzgl. befr. Eier	Anzahl	Anteil bzgl. befr. Eier	Anzahl	Anteil bzgl. Adulter insges.
<i>Df(2L)Msp-300-compl / CyO</i>	1029	966	895	92.65%	458	47.41%	447	46.27%	keine	/
<i>Df(2L)Msp-300-5' / CyO</i>	1021	978	911	93.15%	484	49.49%	466	47.65%	keine	/
<i>Df(2L)Msp-300-3' / CyO</i>	1017	982	914	93.08%	679	69.14%	604	61.51%	31	5.13%

Tabelle 2.1.: Statistische Auswertung der Eigelege der *Msp-300*-Deletions-Stämme. Die Deletionen *Df(2L)Msp-300-compl* und *Df(2L)Msp-300-5'* sind larval letal, erkennbar an dem deutlich reduzierten Anteil sich verpuppender Larven. Hierzu ist zu beachten, dass eine Reduktion um 25% auf das Vorhandensein des CyO-Balancers zurückzuführen ist, der in Homozygotie ebenfalls zu larvaler Letalität führt. Die Deletion *Df(2L)Msp-300-3'* ist semiletal, wobei die meisten Individuen als Larven sterben, einige jedoch auch nach der Verpuppung (vergl. den Anteil verpuppter Larven und geschlüpfter Adulte). Ungefähr 5% der schlüpfenden Adulten sind homozygot für die Deletion.

Df(2L)Msp-300-3'-homozygote Fliegen, in denen auch der für die KASH-Domäne codierende Teil des *Msp-300*-Locus deletiert ist, haben wildtypische Augen. Die KASH-Domänen-Isoformen von *Msp-300* haben somit, im Gegensatz zu *Klar*, keine essentielle Funktion bei der Kernwanderung während der Augenentwicklung. Ähnliche Beobachtungen sind inzwischen auch für eine mittels homologer Rekombination hergestellte *Msp-300*-KASH-Deletion gemacht worden (Poster Präsentation, fly meeting San Diego 2007, Xie et al.). Nach Rekombination der Deletionen auf FRT-Chromosomen haben wir außerdem für die letalen Deletionen Zellklone in der Augenimaginalscheibe induziert. Auch in diesen Fällen konnten wir keinen Augenphänotyp beobachten, schließlich führte auch die Kloninduktion im *klar*-mutanten Hintergrund zu keiner Verstärkung des *klar*-Augen Phänotyps (nicht gezeigt).

2.2.5 Der Dumping-Defekt wird nicht durch den Funktionsverlust von *Msp-300* verursacht

Überraschenderweise legen *Df(2L)Msp-300-3'*-homozygote Weibchen wildtypische Eier. Der Verlust der KASH-Domäne verursacht also nicht den beobachteten Dumping-Phänotyp. Die Induktion von Keimbahnklonen für jede der drei Deletionen, führt in keinem Fall zu einem erkennbaren Eiphänotyp. Auch die Aktin-Färbungen der entsprechenden Eikammern mit Phalloidin zeigten keine Abweichung vom Wildtyp. Diese Resultate deuten darauf hin, dass der beobachtete Dumping-Phänotyp, der durch *Msp-300^{sz75}*-Keimbahnklone hervorgerufen wird, nicht auf die Mutation in *Msp-300* zurückgeht, sondern auf eine weitere, auf demselben Chromosomenarm lokalisierte Mutation.

Diese Vermutung konnten wir durch Rettungsexperimente bekräftigen. Die Duplikation *Dp(2;1)B19*, die den gesamten *Msp-300*-Locus umfasst, konnte die Letalität aller von uns generierten *Msp-300*-Deletionen retten, nicht jedoch den Dumping-Phänotyp des *Msp-300^{sz75}*-Allels. Dieses Ergebnis steht in direktem Gegensatz zu der angeblich beobachteten Rettung des *Msp-300^{sz75}* Dumping-Phänotyps durch dieselbe Duplikation (Yu et al., 2006). Komplementationstests zeigten außerdem, dass alle Deletionen das *Msp-300^{sz75}*-Allel

komplementieren. Interessanterweise komplementieren sich auch die beiden Deletionen *Df(2L)Msp-300-5'* und *Df(2L)Msp-300-3'*. Das deutet darauf hin, dass in dem 5'- und dem 3'-Bereich des *Msp-300*-Locus jeweils unabhängige Genprodukte codiert werden.

Für alle Deletionen gilt schließlich, dass sich in homozygot mutanten Eikammern mit dem von uns verwendeten Antikörper kein Protein mehr nachweisen lässt (Abb. 2.2.5. B-D).

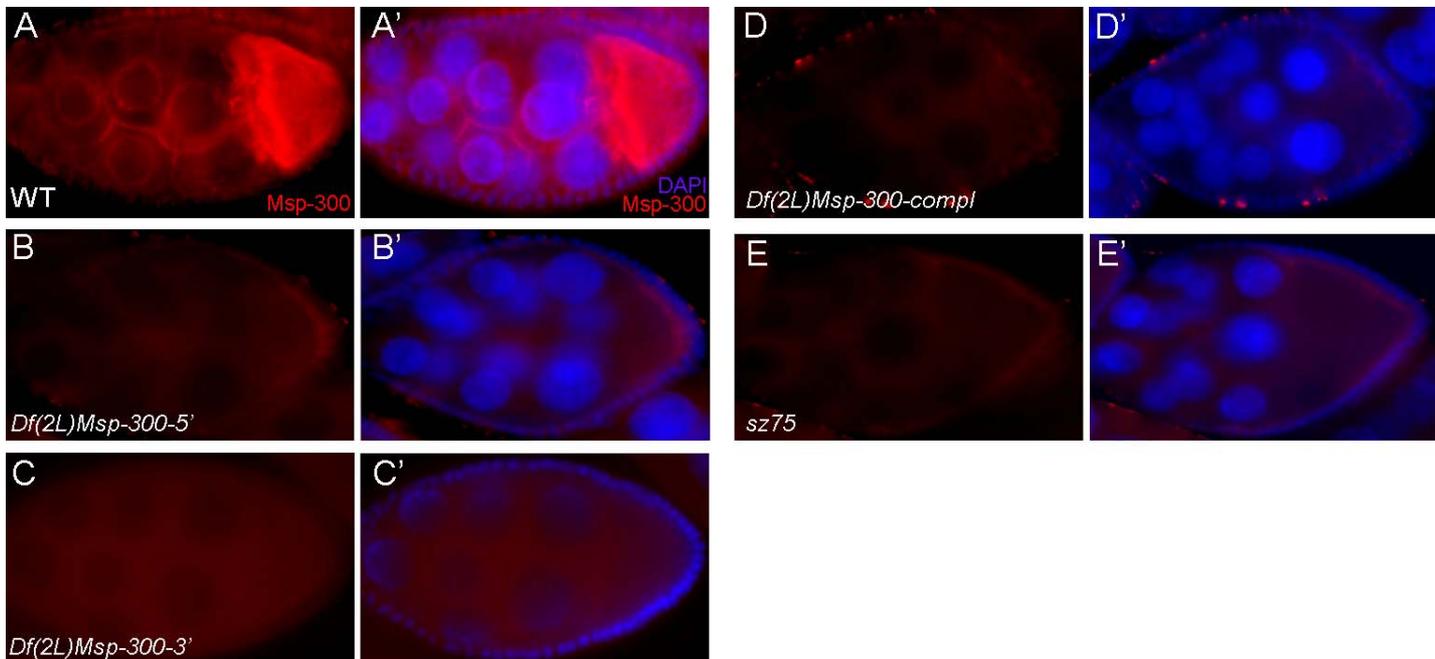


Abbildung 2.2.5.: In Eikammern, die homozygot für die verschiedenen *Msp-300*-Deletionen oder für das Allel *Msp-300^{sz75}* sind, lässt sich mittels anti-*Msp-300* Antikörper Färbungen kein Protein nachweisen. (A-E) Stadium 9 Eikammern, anti-*Msp-300* Färbung in rot, (A'-E') zusätzliche DAPI Färbung in blau (A) Wildtyp-Eikammer, *Msp-300* akkumuliert am Aktinkortex und an der Kernhülle der Nährzellkerne, sowie im Cytoplasma der Oocyte (vergl. Abb. 2.2.1.). (B-E) mutante Eikammern, jeweils homozygot für die links unten angegebenen Deletionen, bzw. Allele. Die Eikammern zeigen jeweils keine Färbung durch den verwendeten anti-*Msp-300* Antikörper.

2.2.6 *Msp-300* und *Klar* haben keine essentielle Funktion in der Oogenese

Um zu untersuchen, ob die parallele Eliminierung der *klar*-Funktion zu einem Oogenese Phänotyp führt, haben wir für die einzelnen *Msp-300*-Deletionen jeweils Keimbahnklone im *klar^{BX12}*-mutanten Hintergrund erzeugt. Auch in dieser doppelt mutanten Situation sind die abgelegten Eier wildtypisch und die Eikammern zeigen keine Anomalien in Phalloidin und anti-Lamin Färbungen. Weder die allgemeine Architektur der Eikammern, noch die Lokalisation der Keimzell-Kerne ist betroffen.

Der *Knock-out* des *Msp-300*-Homologs Nesprin-2 in der Maus führt zu Kernmembran-deformationen in Form von kegelförmigen Ausbuchtungen, die bereits bei geringer Vergrößerung in DAPI Färbungen deutlich sichtbar sind. Die Nesprin-2-defizienten Mäuse sind jedoch lebensfähig, fertil und zeigen keine Abnormitäten gegenüber Wildtyp-Tieren (Dissertation Hafida Zaim).

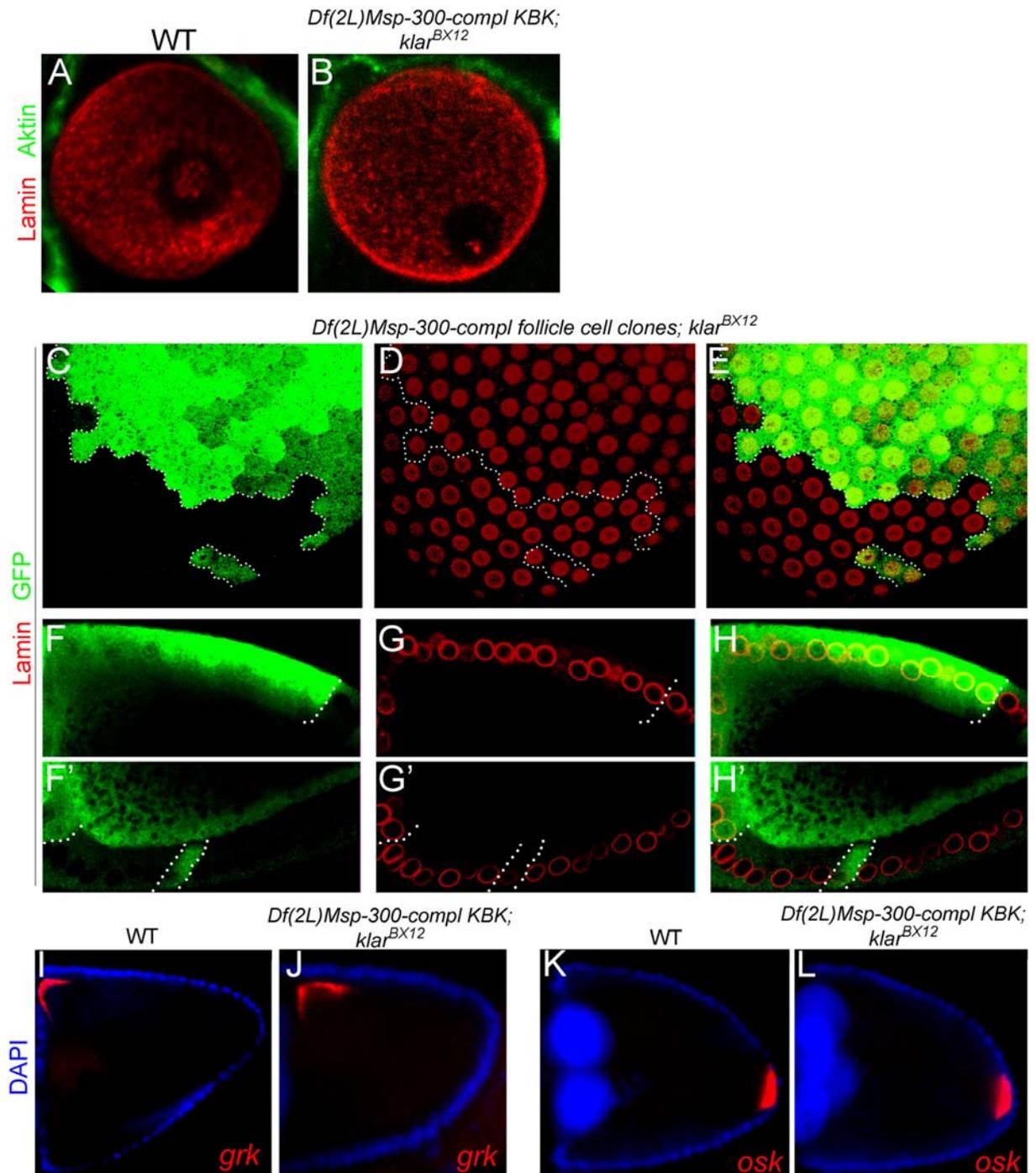


Abbildung 2.2.6.: Der gleichzeitige Verlust von *Msp-300* und *klar* hat keine erkennbaren Auswirkungen auf die Oogenese. (A,B) Oozytenzellkerne von St. 9 Eikammern, Kernmembranen in rot (anti-Lamin), Aktin in grün (FITC Phalloidin) (A) Wildtyp, (B) Eikammer eines Weibchens mit *Df(2L)Msp-300-compl*-Keimbahnklonen im *klar^{BX12}*-mutanten Hintergrund. Die Morphologie des Oozytenkerns ist unverändert. (C-H) St. 10 Eikammern mit *Df(2L)Msp-300-compl*-Follikelzellklonen im *klar^{BX12}*-mutanten Hintergrund. Kernmembranen in rot (anti-Lamin), *Df(2L)Msp-300-compl*-mutante Zellklone sind durch die Abwesenheit von GFP (grün) markiert. (C-D) Aufsicht, (F-H) Konfokale Schnitte. Die Zellkerne innerhalb der mutanten Follikelzellklone zeigen im Vergleich zu den benachbarten Zellen keine Unterschiede in der Morphologie oder der Lokalisation. (I-L) St. 10 Eikammern, DAPI in blau. (I,K) Wildtyp Eikammern (J,L) Eikammern mit *Df(2L)Msp-300-compl* Follikelzellklonen im *klar^{BX12}*-mutanten Hintergrund. (I-J) *gurken* (rot) *in-situ*-Hybridisierung (K,L) *oskar* (rot) *in-situ*-Hybridisierung. Die Lokalisation von *gurken*- und *oskar*-Transkripten ist in mutanten Eikammern im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

Im Gegensatz dazu zeigen in *Drosophila* sowohl die Nährzellkerne (nicht gezeigt) als auch die Oocyten-Zellkerne (Abb. 2.2.6.A, B) in *Msp-300-Del; Klar^{BX12}* Eikammern keinerlei morphologische Veränderung in anti-Lamin Färbungen.

Auch in Follikelzellklonen für die unterschiedlichen *Msp-300*-Deletionen im *klar^{BX12}* Hintergrund war jeweils keine Veränderung in der Morphologie oder der Lokalisation der Zellkerne im Vergleich zum Wildtyp festzustellen (Abb. 2.2.6. C-H).

Als Folge der Überexpression der δ -Isoform von Klar ist eine Reduzierung und veränderte Lokalisation der Grk RNA beobachtet worden (Poster-Präsentation, fly meeting San Diego 2007, Cotton et al.). Um zu untersuchen ob *Msp-300* und Klar eine redundante Rolle bei der RNA-Lokalisation spielen, haben wir an *Msp-300-Del; klar^{BX12}* doppelt mutanten Eikammern fluoreszente *in-situ*-Hybridisierungen für *grk* und *osk* RNA durchgeführt. In beiden Fällen war keine Veränderung in der Menge oder der Lokalisation der RNA im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen (Abb. 2.2.6. I-L).

2.2.7 *Msp-300*-defiziente Fliegen sterben im ersten Larvenstadium

Wie oben beschrieben, sind die Deletionen des *Msp-300*-Locus larval letal (bzw. semiletal, im Falle von *Df(2L)Msp-300-3*). Eine maternale Funktion von *Msp-300* konnten wir ausschließen, da bei den Nachkommen von Weibchen, die Keimbahnklone der *Msp-300*-Deletionen tragen, jeweils keine Letalität auftritt, wenn diese mit wildtypischen Männchen gekreuzt werden. Durch Einkreuzen eines GFP markierten Balancers (CyO, Kr-GFP (Casso et al., 2000)) konnten wir den Zeitpunkt der Letalität genauer ermitteln. Es stellte sich heraus, dass die Larven während des ersten Larvenstadiums sterben. Da *Msp-300* in allen Muskelzellen hoch exprimiert wird und *Msp-300^{sz75}*-mutante Embryonen einen schwachen Myogenese-Phänotyp zeigen (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992), liegt die Vermutung nahe, dass die Letalität der Deletionen auf einen Defekt im Muskelsystem zurückgeht. Die homozygot mutanten Larven zeigen jedoch zunächst keine phänotypischen Auffälligkeiten und bewegen sich normal. Die Bewegungen werden mit der Zeit langsamer und die Larven sterben jeweils vor Eintritt in das zweite Larvenstadium. Durch mikroskopische Analyse des Muskelsystems lebender Larven in polarisiertem Licht konnten wir keine phänotypischen Unterschiede in der Anordnung und Bewegung der Muskeln zwischen wildtypischen und homozygot mutanten Larven beobachten. Die Aufdeckung einer potentiellen Funktion von *Msp-300* bei der Myogenese bedarf daher einer detaillierteren Analyse des larvalen Muskelsystems in *Msp-300*-mutanten Embryonen.

Da *Msp-300* auch in der viszeralen Muskulatur exprimiert wird, haben wir untersucht, ob mutante Larven (homozygot für *Df(2L)Msp-300-comp1*), als Folge eines Defekts bei der Nahrungsaufnahme verhungern. Durch Fütterung mit gefärbter Hefe zeigte sich jedoch, dass die Nahrung normal aufgenommen und bis in den Darm transportiert wird (Abb. 2.2.7.). Hierdurch kann zumindest ein mechanischer Defekt bei der Nahrungsaufnahme ausgeschlossen werden.

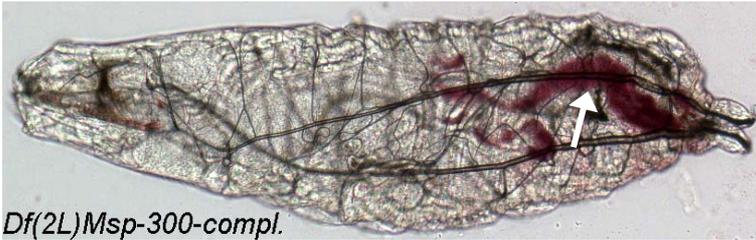


Abbildung 2.2.7.: Die Nahrungsaufnahme ist in *Msp-300-loss-of-function* Larven nicht beeinträchtigt. Gezeigt ist eine *Df(2L)Msp-300-compl*-homozygote Larve (anterior links), die mit Carminrot gefärbter Hefe gefüttert wurde. Die Rotfärbung des Darms am posterioren Ende der Larve (Pfeil) zeigt, dass die Hefe aufgenommen und bis in den Darm transportiert worden ist.

2.2.8 Die Kernmorphologie während der frühen Embryogenese wird durch den Verlust von *Msp-300* und *klar* nicht verändert

Neben der Oogenese und der Augenentwicklung, ist die kortikale Wanderung der Zellkerne bei der Bildung des syncytialen Blastoderms, während der frühen Embryogenese, ein weiteres Muster-Beispiel für die Rolle der Kernwanderung während der Entwicklung von *Drosophila*. Ein Versagen dieses Prozesses ist für den Embryo letal. Da die Deletion des gesamten *Msp-300*-Locus erst während des ersten Larvenstadiums zu Letalität führt, kann die syncytiale Kernwanderung in *Msp-300*-mutanten Embryonen jedoch nicht gravierend beeinträchtigt sein.

Im Verlauf der frühen Embryogenese kommt es auch zu einer Veränderung der Kernmorphologie, in Form einer deutlichen (~2,5 fachen) Elongation der zuvor kugelförmigen Zellkerne. Die Gene *kurzkern* (*kur*) und *kugelkern* (*kuk*, auch *charleston*, *char*) spielen dabei eine entscheidende Rolle, da in beiden Fällen eine Beeinträchtigung der Genfunktion zu einem Abrunden der Zellkerne führt (Brandt et al., 2006; Pilot et al., 2006). Da *kuk*-defiziente Fliegen lebensfähig und fertil sind, scheint die im Wildtyp stattfindende Elongation der Zellkerne jedoch keine essentielle Funktion zu haben (Brandt et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob *klar* und *Msp-300* eine redundante Funktion bei der Regulation der Kernmorphologie oder Lokalisation in der frühen Embryogenese haben, haben wir homozygot *klar^{BX12}*-mutante Weibchen, die *Df(2L)Msp-300-compl*-Keimbahnklone tragen, mit *Df(2L)Msp-300-compl/CyO; klar^{BX12}/klar^{BX12}* Männchen gekreuzt. Da das in dem von uns verwendeten *CyO*, *Kr-GFP*-Balancer verwendete *Kr-GFP* Konstrukt in der frühen Embryogenese nicht exprimiert wird, und da sich auch *Msp-300* mit dem von uns verwendeten Antikörper in der frühen Embryogenese nicht nachweisen lässt, konnten wir die aus der oben genannten Kreuzung resultierenden homozygoten *Df(2L)Msp-300-compl*-Embryonen nicht direkt identifizieren. Allerdings sollten 50% der Nachkommen homozygot für die *Msp-300*-Deletion und das *klar*-Allel sein. Wir konnten bei über 100 untersuchten Embryonen keinerlei Veränderung der Kernmorphologie (oder Lokalisation) zu irgendeinem Zeitpunkt in der frühen Embryogenese feststellen. Die Abbildung 2.2.8. zeigt als Beispiel die unveränderte Anordnung und Form der elongierten Zellkerne während der Zellularisierung.

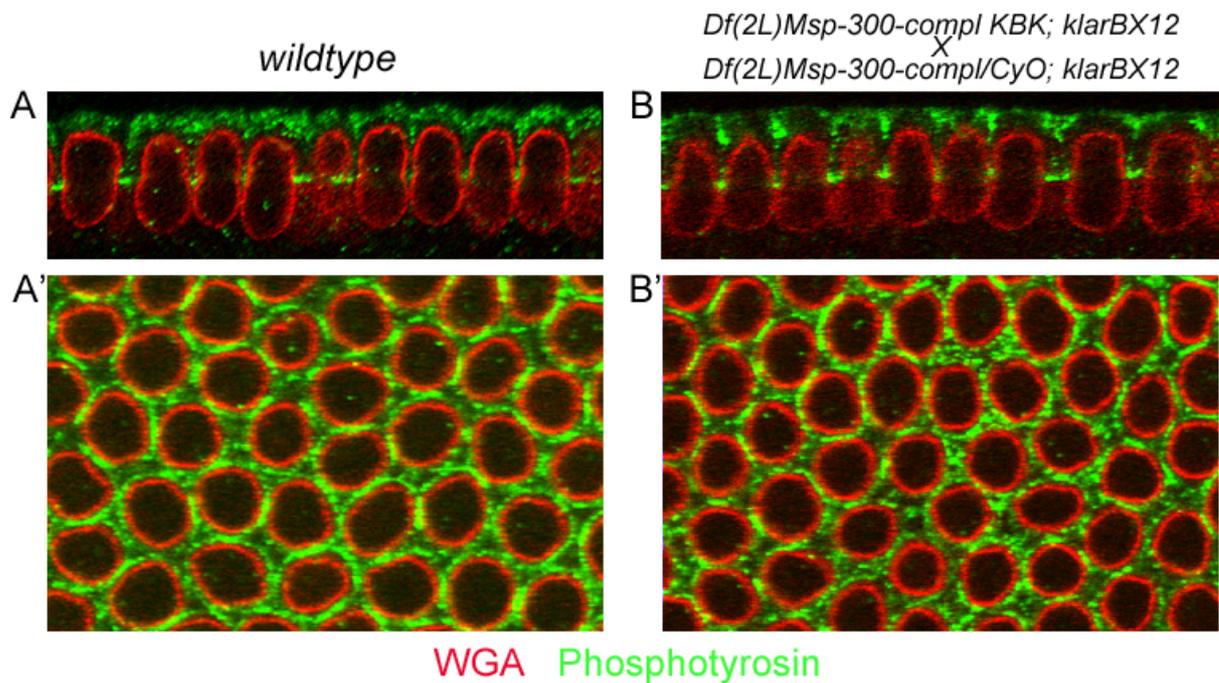


Abbildung 2.2.8.: Die Kernmorphologie und –Lokalisation während der Zellularisierung im frühen Embryo wird durch den Verlust von *Msp-300* und *klar* nicht verändert. (A) Wildtyp Embryo, (B) Beispiel eines Embryos aus dem Gelege der Kreuzung eines Weibchens mit *Df(2L)Msp-300-compl*-Keimbahnklonen im *klar^{BX12}*-mutanten Hintergrund, gekreuzt mit *Df(2L)Msp-300-compl / CyO; klar^{BX12}* Männchen. Bei über hundert analysierten Embryonen trat in jedem Fall der hier gezeigte, wildtypische Phänotyp auf. Fluoreszent markiertes Weizenkeim-Agglutinin (wheat-germ-agglutinin, WGA, rot) markiert die Kernmembranen, Antikörper gegen Phosphotyrosine (grün) die einwandernden Plasmamembranen.

2.2.9 Versuche zur Identifizierung der *sz75*-Dumping-Mutation

Um die Mutation zu identifizieren, die den Dumping-Phänotyp in *Msp-300^{sz75}*-homozygoten Fliegen (oder in Weibchen mit *Msp-300^{sz75}*-Keimbahnklonen) hervorruft, haben wir eine Reihe von Komplementationstests durchgeführt. Da der Phänotyp in Keimbahnklonen auftritt, die spezifisch für den linken Arm von Chromosom 2 waren (Chr. 2L), konnten wir uns bei der Suche nach der Dumping-Mutation auf diesen Chromosomenarm beschränken.

Auf Chr. 2L liegen drei Gene, deren Mutation bekanntermaßen zu einem spezifischen Dumping-Phänotyp führt: *chickadee (chic)*, *kelch (kel)* und *quail (qua)* (Cooley et al., 1992; Mahajan-Miklos and Cooley, 1994b; Matova et al., 1999; Tilney et al., 1996; Xue and Cooley, 1993). Obwohl sich der für diese Gene beschriebene Dumping-Phänotyp im Detail von dem von uns beobachteten unterscheidet, ist nicht auszuschließen, dass wir es mit einem neuen Allel für eines der o.g. Gene zu tun haben, welches einen veränderten Phänotyp hervorruft. Daher haben wir mit den verfügbaren Allelen der genannten Gene (s. Material und Methoden) Komplementationstests gegen *Msp-300^{sz75}* durchgeführt. Die Eigelege transheterozygoter Fliegen waren jedoch in allen Fällen wildtypisch.

Um die Lage der Dumping-Mutation ansatzweise zu kartieren, haben wir außerdem mit den Linien des Bloomington Deficiency Kit für Chromosomenarm 2L Komplementationstests durchgeführt. Auch in diesem Fall traten für alle Defizienzen transheterozygote Weibchen mit *Msp-300^{sz75}* auf, die jeweils wildtypische Eier ablegten. Das Ergebnis der Defizienzkartierung

deutet darauf hin, dass die von uns gesuchte Mutation in einer der Regionen liegt, die von den Defizienzen des Kits nicht abgedeckt werden. Diese Lücken machen insgesamt ungefähr 5% von Chr. 2L aus (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df-dp/dfkit-info.htm>). Es ist jedoch auch möglich, dass sich die Mutation mit Hilfe von Defizienzen nicht kartieren lässt (siehe Diskussion).

2.2.10 Deletion des *Drosophila* SUN-Domänen-Homologs CG18584/CG3287 (*Df(2R)d06841-f07700*)

Von den beiden in *Drosophila* identifizierten SUN-Domänen-Proteinen CG18584 und CG6589 zeigt das erstgenannte die höchste Homologie zu *C. elegans* Unc84 und Maus SUN1, welche jeweils mit den typischen KASH-Domänen-Proteinen ANC-1, bzw. Nesprin-1 und -2 interagieren. Für CG18584 wurde außerdem kürzlich gezeigt, dass es in Eikammern sowohl in Keimzellen, als auch in Follikelzellen an der Kernhülle lokalisiert (Kracklauer et al., 2007). CG6589 zeigt die höchste Homologie zu *C. elegans* MTF-1/SUN-1, welches mit Zyg-12 interagiert. Obwohl Zyg-12 eine ähnliche Funktion wie Klar ausübt unterscheidet es sich deutlich von Klar, so zeigt die KASH-Domäne von Zyg-12 nur eine sehr geringe Homologie zu allen anderen identifizierten KASH-Domänen, und die Eingliederung von Zyg-12 als KASH-Domänen-Protein beruht vorwiegend auf der funktionellen Homologie mit Klar. CG6589 wird außerdem ausschließlich in Männchen exprimiert (Poster-Präsentation, fly meeting San Diego 2007, Kracklauer et al.).

Wir haben, wie weiter oben im Fall von *Msp-300* beschrieben, für CG18584 eine Deletion mit Hilfe von Exelixis-Insertionen hergestellt (*Df(2R)d06841-f07700*). Neben der kompletten Deletion des CG18584-Locus ist in diesem Fall auch ein Großteil des annotierten Gens CG3287 deletiert (s. Abb. 2.2.9.). Die molekulare Funktion von CG3287 ist unbekannt.

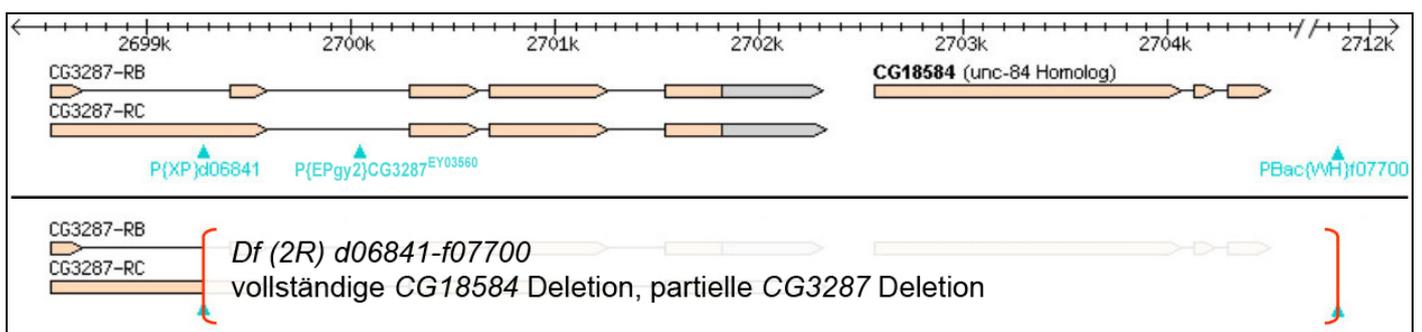


Abbildung 2.2.9.: Mit Hilfe von Exelixis-Insertionen generierte Deletion von CG18584/CG3287. Im oberen Teil der Abbildung sind die annotierten Transkripte der Gene CG3287 und CG18584 (auch *klaroid*, homolog zu *C. elegans* unc-84) dargestellt, außerdem ist die Lage der verwendeten Exelixis Insertionen durch Pfeilspitzen markiert (türkis). Darunter ist die genaue Lage der Deletionen *Df(2R)d06841-f07700* gezeigt, der transparente Teil zwischen den roten Klammern ist deletiert.

Es gibt jedoch Hinweise, dass in dem als CG18584 annotierten Gen der 5'-Bereich der Sequenz fehlt bzw. falsch annotiert ist, und dass die beiden Gene CG3287 und CG18584 zu einem gemeinsamen Locus gehören und CG3287 den 5'-Teil des *Drosophila* SUN-

Domänen-Homologs codiert (persönliche Kommunikation Martin Kracklauer und Bernhard Hampoelz). Ich werde daher im Folgenden diesen Locus als CG3287/CG18584 bezeichnen. Der Translationsstart von CG3287 liegt 3' von der Insertion P{XP}d06841 (innerhalb des zweiten Exons der annotierten Splice-Variante CG3287-RB), so dass in unserer Deletion die codierenden Bereiche beider einzeln annotierten Gene (CG3287 und CG18584) vollständig deletiert sind. Damit handelt es sich bei der von uns generierten Deletion *Df(2R)d06841-f07700* mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine vollständige Funktionsverlust-Mutation für beide Gene.

Die Deletion *Df(2R)d06841-f07700* führt zu Semiletalität (ca. 4% Homozygote), wobei die homozygoten Fliegen einen „raue Augen“-Phänotyp zeigen, der identisch mit dem *klar* Phänotyp ist. Der Augenphänotyp wird in *Df(2R)d06841-f07700; klar^{BX12}*-doppelt-mutanten Individuen nicht verstärkt. Der beobachtete, *klar* identische Augenphänotyp, ist inzwischen auch für eine mittels homologer Rekombination hergestellte Mutation beschrieben worden, in der die gesamte annotierte *CG18584*-Region ausgetauscht ist, während die *CG3287*-Region nicht verändert ist (das hat zu der Namensgebung *klaroid* für *CG18584* geführt (Kracklauer et al., 2007)). Fliegen, die für diese Funktionsverlust-Mutation des *CG18584*-Locus homozygot sind, sind lebensfähig und fertil, so dass die beobachtete Semiletalität im Fall des von generierten Deletions-Allels auf die zusätzliche Deletion des *CG3287*-Abschnitts zurückzuführen ist.

Innerhalb von *CG3287* gibt es zwei P-Element-Insertionen, P{XP}d06841 und P{EPgy2}CG3287^{EY03560} (s. Abb. 2.2.9.). Aufgrund der oben angesprochenen Hinweise anderer Gruppen, dass die Annotationen bezüglich *CG3287* und *CG18584* fehlerhaft sind und dass diese getrennt annotierten Gene einen gemeinsamen Locus bilden, haben wir die beiden P-Insertions-Fliegenstämme genauer analysiert. Dabei konnten wir im Fall der Insertion P{EPgy2}CG3287^{EY03560} Semiletalität und einen *klar*-artigen „raue Augen“-Phänotyp identifizieren. Diese Insertion führt damit anscheinend zu einem Phänotyp, der mit unserer Gesamtdeletion vergleichbar ist. Diese Beobachtung bestätigt somit die Vermutung, dass *CG3287* und *CG18584* Teile eines gemeinsamen Locus sind.

In den Ovarien *Df(2R)d06841-f07700*-homozygoter Weibchen lassen sich keinerlei Kernlokalisationsdefekte beobachten. Übereinstimmend mit den Resultaten bezüglich der KASH-Domänen-Proteine zeigt damit auch der Funktionsverlust des einzigen in Weibchen exprimierten SUN-Domänen-Proteins keine Auswirkungen auf die Oogenese.

2.2.11 In CG3287/CG18584-defizienten Eikammern unterbleibt die Kernhüllen-Lokalisation von Msp-300 und Klarsicht

In *C. elegans* und Säugern ist gezeigt worden, dass die Lokalisation und Verankerung von KASH-Domänen-Proteinen an der äußeren Kernmembran auf einer direkten Interaktion mit SUN-Domänen-Proteinen in der inneren Kernmembran beruht, und dass Mutationen der SUN-Domänen-Proteine zum Verlust der Akkumulation von KASH-Domänen-Proteinen an der Kernhülle führen (Haque et al., 2006; McGee et al., 2006; Padmakumar et al., 2005; Starr and Han, 2002).

Tatsächlich unterbleibt sowohl in anti-Klar als auch in anti-Msp-300 Antikörperfärbungen an *Df(2R)d06841-f07700* Ovarien die im Wildtyp beobachtete Akkumulation an der Kernhülle

(Abb. 2.2.10.), wohingegen die bereits in frühen Oogenesestadien beobachtete allgemeine Akkumulation von Msp-300 in der Oocyte (Abb. 2.2.1.A) nicht beeinträchtigt wird (nicht gezeigt). Dieses Resultat zeigt, dass das *Drosophila* SUN-Domänen-Protein CG3287/CG18584 bei beiden *Drosophila* KASH-Proteinen für die Lokalisation an der Kernhülle essentiell ist.

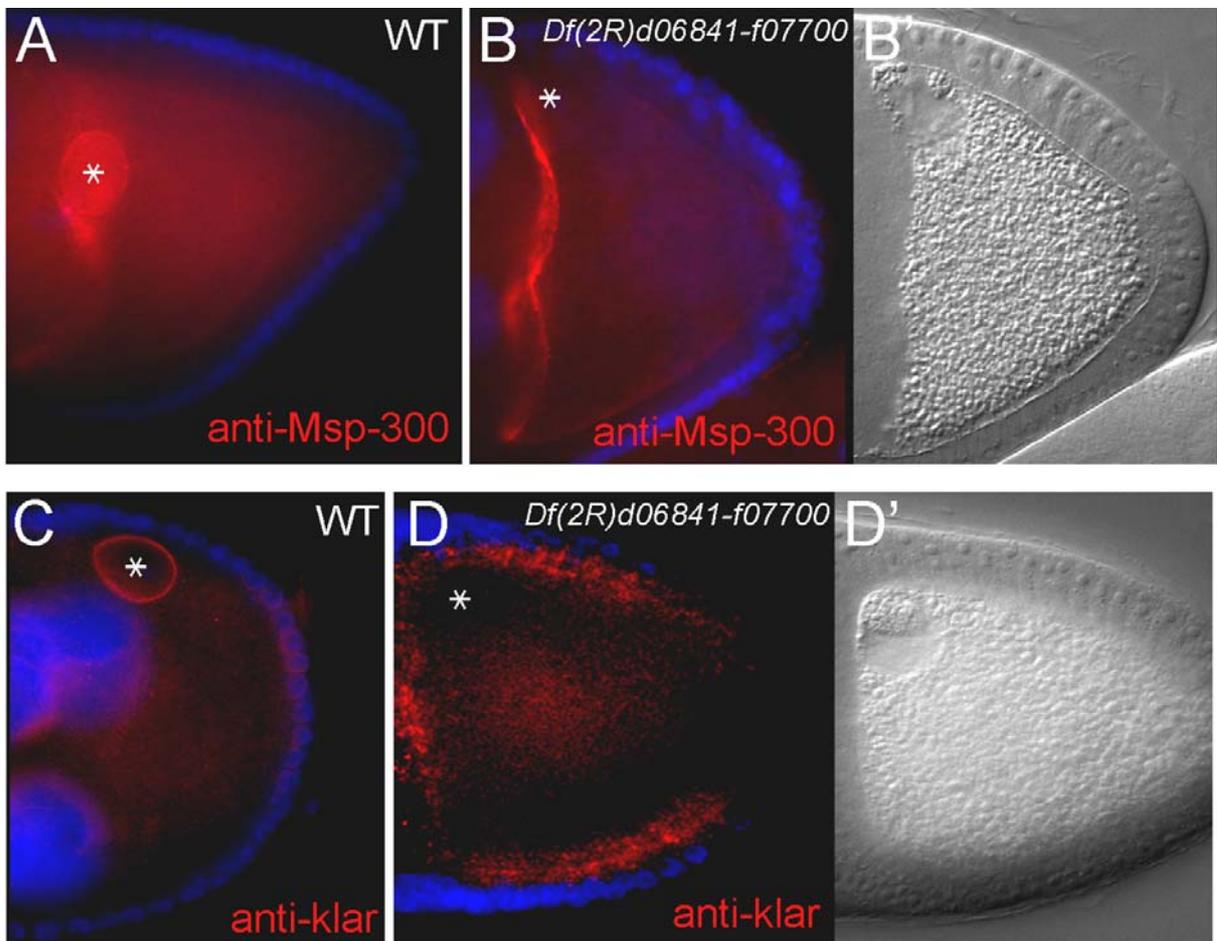


Abbildung 2.2.10.: In *Df(2R)d06841-f07700*-homozygoten Eikammern unterbleibt die Kernhüllen-Lokalisation von Msp-300 und Klar. (A-D) Stadium 9 Eikammern. DNA in blau (DAPI), die Lage des Oocytenkerns ist durch einen Stern markiert (A,B) anti-Msp-300 in rot (C,D) anti-Klar in rot (B',D') Normarski Aufnahme zur Visualisierung des Oocytenkerns. (A,C) Wildtyp Eikammern, (B,D) *Df(2R)d06841-f07700* Eikammern.

2.3 Diskussion

2.3.1 *Drosophila* KASH-Domänen-Proteine haben keine Funktion in der Oogenese

Die beschriebenen Funktionen der KASH- und der SUN-Domänen-Proteine bei der Kernpositionierung in *C.elegans* und in Vertebraten haben uns veranlasst, die entsprechenden *Drosophila*-Homologe auf eine potentielle Funktion bei der Kernpositionierung während der Oogenese hin zu untersuchen. Msp-300 wurde zunächst aufgrund der spezifischen Expression im gesamten Muskelsystem des *Drosophila*-Embryos identifiziert (Volk, 1992). Wir konnten zeigen, dass Msp-300 auch während der Oogenese exprimiert wird und dort speziell in den Keimzellen vor allem an der Kernhülle und am Aktin-Kortex akkumuliert. Klarsicht wird ebenfalls während der Oogenese exprimiert und lokalisiert sowohl in den Keimzellen als auch in den somatischen Follikelzellen an der Kernhülle. Obwohl diese deutliche Expression der beiden in *Drosophila* identifizierten KASH-Domänen-Proteine auf eine mögliche Funktion während der Oogenese hinweist, konnten wir zeigen, dass der Funktionsverlust der beiden Proteine während der Oogenese keine phänotypischen Auswirkungen hat.

Durch die Generierung einer molekular definierten Deletion des gesamten *Msp-300*-Locus stand uns erstmals ein nachweisliches Nullallel zur Verfügung. Dieses Deletions-Allel verdeutlicht auch, dass es sich bei dem einzigen bisher verfügbaren mutanten Allel *Msp-300^{sz75}*, entgegen der früheren Darstellung (Yu et al., 2006) nicht um ein loss-of-function-Allel handelt. Wir konnten beobachten, dass dieses Nonsense-Allel nur semiletal ist, da nach Rekombination des Allels auf ein FRT-Chromosom transheterozygote Fliegen auftreten, die homozygot für das *Msp-300^{sz75}*-Allel sind. Im Gegensatz dazu sind sowohl die Gesamtdelation *Df(2L)Msp-300-compl* als auch die Teildelation *Df(2L)Msp-300-5'* absolut letal. Die Tatsache, dass Fliegen, deren Keimbahn homozygot für die Gesamtdelation von *Msp-300* ist, keine Defekte in der Oogenese aufweisen, beweist insbesondere, dass der in *Msp-300^{sz75}*-Keimbahnklonen beobachtete Dumping-Phänotyp (Yu et al., 2006) nicht auf das *Msp-300^{sz75}*-Allel zurückzuführen ist, sondern auf eine andere, auf demselben Chromosomenarm lokalisierte Mutation. Bestätigt wird das durch die Beobachtung, dass eine den *Msp-300*-Locus umfassende Duplikation (*Dp19*) zwar die Letalität der *Msp-300*-Deletionen retten kann, nicht jedoch den Dumping-Phänotyp des *Msp-300^{sz75}*-Allels. Diese Beobachtung steht wiederum in direktem Gegensatz zu der früheren Darstellung bei Yu et al. (Yu et al., 2006).

Aufgrund der Tatsache, dass auch der gleichzeitige Funktionsverlust von Msp-300 und Klarsicht während der Oogenese zu keinem offensichtlichen Phänotyp führt, lässt sich auch eine redundante Funktion der beiden KASH-Domänen-Proteine in der Oogenese weitgehend ausschließen. Allerdings hat sich unlängst herausgestellt, dass möglicherweise unter den bisher verfügbaren *klar*-Allelen, entgegen bisheriger Darstellung (Fischer-Vize and Mosley, 1994), keine Nullallele sind. Während alle bisher untersuchten *klar*-Allele homozygot lebensfähig sind, ist eine kürzlich hergestellte vollständige Deletion des gesamten *klar*-Locus

semiletal (persönliche Kommunikation Michael Welte und Poster-Präsentation, fly meeting San Diego 2007, Jain et al.). Dabei zeigen die überlebenden homozygoten Fliegen unter anderem einen bisher nicht beobachteten Defekt bei der Eiablage. Wir konnten allerdings weder an den Eiern noch an den Ovarien dieser Fliegen morphologische Defekte erkennen. Außerdem ist der *klar*-Locus intensiv auf unterschiedliche Isoformen hin untersucht worden und verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Bereiche der codierten Proteine sind generiert worden (Fischer et al., 2004; Guo et al., 2005; Kracklauer et al., 2007; Mosley-Bishop et al., 1999). Alle bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die während der Oogenese exprimierten Isoformen von Klar durch das von uns verwendete Allel *klar*^{BX12} eliminiert werden. Insbesondere ist in diesem Allel nachweislich die KASH-Domäne deletiert (Guo et al., 2005). Da Msp-300 und Klar außerhalb der KASH-Domäne keinerlei Homologie aufweisen, ist eine redundante Funktion beider Proteine nur für die entsprechenden KASH-Domänen-Isoformen zu erwarten. Eine weitere Bestätigung dafür, dass eine KASH-Domänen vermittelte Funktion in der Oogenese keine Rolle spielt, liefert die von uns generierte Deletion des CG3287/CG18584-Locus. Diese Deletion führt zu einem Funktionsverlust des einzigen in Weibchen exprimierten *Drosophila* SUN-Domänen-Homologs (s.u.). Dieser Funktionsverlust bewirkt, dass beide KASH-Domänen-Proteine nicht wie im Wildtyp an der Kernhülle lokalisieren. Diese Mislokalisierung der KASH-Domänen-Proteine hat jedoch keinen sichtbaren Oogenese-Phänotyp zur Folge.

Insgesamt gehen wir daher davon aus, dass Msp-300 und Klar tatsächlich keinerlei redundante Funktion in der Oogenese haben. Die endgültige Klarheit darüber kann jedoch erst durch die Analyse von Eikammern erhalten werden, die doppelt mutant für die kompletten Deletionen beider Gene sind. Dazu muss zunächst die oben genannte *klar*-Deletion auf ein FRT-Chromosom rekombiniert werden, was momentan verfolgt wird.

2.3.2 Die Kernhüllen-Lokalisation von Msp-300 und Klar basiert auf der Interaktion der KASH-Domäne mit dem SUN-Domänen-Protein CG3287/CG18584

Für Klar ist gezeigt worden, dass die in Eikammern exprimierte Isoform eine KASH-Domäne enthält. Auch für Msp-300 deutet die Kernlokalisierung darauf hin, dass wir mit unserem Antikörper eine (oder mehrere) KASH-Domänen-Isoform(en) nachweisen. Die Beobachtung, dass eine GFP-Fusion der Msp-300 KASH-Domäne ebenfalls an der Kernhülle akkumuliert, deutet darauf hin, dass in der Tat die KASH-Domäne für die beobachtete Kernlokalisierung verantwortlich ist. Wie zu erwarten, geht als Folge einer gezielten Deletion der KASH-Domäne tatsächlich die Kernhüllen-Lokalisation von Msp-300 verloren (Poster-Präsentation, fly meeting San Diego 2007, Xie et al.). Auch eine in der Augen-Imagininalscheibe exprimierte GFP-Fusion der Klar-KASH-Domäne akkumuliert an der Kernhülle (Kracklauer et al., 2007). Außerdem gilt auch für Klar, dass sich in mutanten Allelen, in denen insbesondere die Expression der KASH-Domäne betroffen ist, keine Kernhüllen-Lokalisation detektieren lässt (Guo et al., 2005).

Alle diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass parallel zu den Orthologen in anderen Organismen, auch die *Drosophila* KASH-Domänen-Isoformen von Msp-300 und Klar mittels der KASH-Domäne an der Kernmembran lokalisieren.

Die Untersuchung des SUN-Domänen-Proteins CG3287/CG18584 (Klaroid) zeigt außerdem, dass auch in *Drosophila* eine Interaktion der KASH-Domänen-Proteine mit den SUN-Domänen-Proteinen für die Kernlokalisation entscheidend ist. Die Analyse des CG3287/CG18584-Deletionsallels (*Df(2R)d06841-f07700*) demonstriert, dass CG3287/CG18584 in Eikammern sowohl mit Klar, als auch mit Msp-300 interagiert. Der in *Df(2R)d06841-f07700*-homozygoten Fliegen auftretende *klar*-identische Augenphänotyp zeigt, dass CG3287/CG18584 außerdem im Auge für die Funktion von Klar essentiell ist.

Von den beiden in *Drosophila* vorkommenden SUN-Domänen-Proteinen CG3287/CG18584 und CG6589 (Giacomo), weist CG3287/CG18584 die höhere Homologie zu den typischen SUN-Orthologen anderer Organismen auf. Wie in der Einleitung ausgeführt, sind CG3287 und CG18584 in flybase als zwei getrennte Gene annotiert, wobei ursprünglich das Gen CG18584 als SUN-Domänen-Homolog identifiziert wurde. Die Identifikation von CG18584 als typisches SUN-Domänen-Homolog ist jedoch zweifelhaft, da sich für CG18584, im Gegensatz zu allen bisher identifizierten Orthologen, keine potentiellen Transmembran-Domänen (TM) identifizieren lassen (Starr and Han, 2003). Die Beobachtung, dass sich dagegen innerhalb der Aminosäure-Sequenz von CG3287 tatsächlich zwei deutliche TM identifizieren lassen (persönliche Kommunikation Martin Kracklauer), ist somit ein wichtiger Hinweis darauf, dass CG3287 und CG18584 als Teil eines Gesamttranskriptes exprimiert werden, welches das typische SUN-Domänen-Ortholog in *Drosophila* codiert. CG6589, das andere *Drosophila*-Protein mit einer SUN-Domäne, wird nur in Männchen exprimiert und hat dort eine essentielle Funktion bei der Spermatogenese, die jedoch wahrscheinlich unabhängig von einer Interaktion mit KASH-Domänen-Proteinen ist (Poster-Präsentation, fly meeting San Diego 2007, Kracklauer et al.). Wir gehen daher davon aus, dass CG3287/CG18584 das einzige *Drosophila* SUN-Protein ist, das bei der Interaktion mit KASH-Proteinen eine Rolle spielt. Wie im Fall von Msp-300 gibt es jedoch auch für CG3287/CG18584 bisher wenige experimentelle Daten bezüglich der tatsächlich exprimierten Isoformen.

Die Überexpression der KASH-Domäne führt im Fall von ANC-1 in *C.elegans* und von Syne-1 in der Maus zu deutlichen, dominant-negativen Effekten, wahrscheinlich aufgrund der Verdrängung des endogenen Proteins von in limitierter Zahl vorhandenen Bindestellen an der Kernhülle durch das ektopisch exprimierte GFP-Fusionsprotein (Grady et al., 2005; Libotte et al., 2005; Starr and Han, 2002; Zhen et al., 2002). Da unsere Ergebnisse deutlich machen, dass *Msp-300* und *klar* in der Oogenese keine essentielle Funktion haben, überrascht es zunächst nicht, dass wir als Folge der Überexpression der Msp-300-KASH-Domäne in Form des GFP-KASH-Konstrukts keine dominant negativen Phänotypen beobachtet haben. Es ist jedoch gezeigt worden, dass auch die Überexpression eines Msp-300-KASH- oder eines Klar-KASH-Konstrukts in der Augenimaginalscheibe keine phänotypischen Auswirkungen hat, obwohl bei der Funktion von *klar* in der Augenentwicklung die KASH-Domäne eine entscheidende Rolle spielt (Fischer et al., 2004; Kracklauer et al., 2007; Patterson et al., 2004). Das deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu der Situation in *C. elegans* und in der Maus die Bindestellen für die KASH-Domäne in der Kernhülle nicht in limitierter Zahl vorhanden sind. Da im Vergleich zu der anti-Msp-300-

Antikörperfärbung ein größerer Anteil des GFP-KASH-Konstrukts im Cytoplasma lokalisiert (das gilt auch im Falle des beschriebenen Klar-GFP-KASH-Konstrukts (Kracklauer et al., 2007)), ist es auch möglich, dass in dem GFP-Konstrukt Bereiche fehlen, die für eine optimale Bindung an die Kernhülle benötigt werden.

2.3.3 Die essentielle Funktion von Msp-300 besteht möglicherweise nicht in der Kernpositionierung

Da die komplette Deletion des *Msp-300*-Locus letal ist, muss Msp-300 eine essentielle Funktion in der Entwicklung von *Drosophila* haben. Die starke Expression im gesamten embryonalen Muskelsystem und der im Fall von *Msp-300^{sz75}* beobachtete Muskel-Phänotyp deuten darauf hin, dass Msp-300 eine Funktion bei der Myogenese hat (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992). Allerdings konnten wir zeigen, dass im Hintergrund des *Msp-300^{sz75}*-Allels weitere Mutationen vorliegen, so dass die Analyse des Muskelphänotyps mit „sauberen“ Allelen wiederholt werden muss. Insbesondere konnten wir nachweisen, dass das *Msp-300^{sz75}*-Allel nicht letal ist. Bei der Analyse des Muskelphänotyps wurde die beobachtete embryonale Letalität darauf zurückgeführt, dass die Larven, als Folge des Muskeldefekts, nicht aus dem Chorion schlüpfen können. Die embryonale Letalität geht jedoch auf sekundäre Mutationen im Hintergrund des *Msp-300^{sz75}*-Allels zurück.

Die *Msp-300*-Gesamtdeletion zeigt, dass der Funktionsverlust von *Msp-300* tatsächlich zu larvaler und nicht zu embryonaler Letalität führt. Wir konnten bisher weder durch Färbung des embryonalen Muskelsystems mit anti-Myosin-Antikörpern, noch durch die lichtmikroskopische Untersuchung des larvalen Muskelsystems einen deutlichen Muskelphänotyp erkennen. Allerdings ist auch der für das *Msp-300^{sz75}*-Allel beschriebene Muskeldefekt sehr schwach ausgeprägt, so dass die Analyse der Funktion von Msp-300 in der Myogenese wahrscheinlich einige Erfahrung bei der Analyse des Muskelsystems erfordert. Ob die larvale Letalität der *Msp-300*-Gesamtdeletion auf einen Muskeldefekt oder auf andere physiologische Defekte zurückzuführen ist, bleibt daher bislang ungeklärt.

Auch über die Funktionen von Msp-300 auf zellulärer Ebene bisher nur spekuliert werden. Die Tatsache, dass für das Vertebraten KASH-Protein Syne-1 eine Funktion bei der Kernverankerung in der Muskelentwicklung beobachtet wurde, hat zu der Vermutung geführt, dass der *Msp-300^{sz75}*-Muskelphänotyp in *Drosophila* ebenfalls auf einen Kernverankerungs-Defekt zurückgeht (Grady et al., 2005; Zhang et al., 2007). Die von uns nachgewiesene Konservierung der SUN-Protein–KASH-Protein Interaktion in *Drosophila* ist bisher der deutlichste Hinweis, dass eine KASH-Isoform von Msp-300 in *Drosophila* exprimiert wird. Allerdings zeigt die Tatsache, dass eine spezifische Mutation von CG18584, in welcher auch der die SUN-Domäne codierende Teil mutiert ist, nicht letal ist (Kracklauer et al., 2007), dass die Letalität der *Msp-300*-Deletionen (bzw. die Semiletalität im Fall von *Df(2L)Msp-300-3'*), höchstwahrscheinlich nicht auf eine Funktion zurückgeht, bei der die Kernlokalisation der KASH-Domäne eine Rolle spielt.

Auch der Vergleich der von uns generierten Teildeletionen des *Msp-300*-Locus deutet darauf hin, dass eine Msp-300-Isoform mit einer N-terminalen, Aktin-bindenden CH-Domäne und einer C-terminalen KASH-Domäne keine essentielle Rolle in der Entwicklung von *Drosophila*

spielt. Die Deletion der 5'-Region des Locus, die auch den CH-Domänen codierenden Teil deletiert, den KASH-Domänen codierenden Abschnitt aber gänzlich unbeschädigt lässt, ist absolut letal. Dagegen ist die komplementäre Teildeletion, bei der die KASH-Domäne deletiert ist, nur semiletal. Das deutet darauf hin, dass Msp-300-Isoformen, welche nur die Aktin-bindenden CH-Domänen enthalten, eine bedeutendere Rolle spielen, als spezielle KASH-Domänen-Isoformen. Darüber hinaus komplementieren sich die beiden Teildeletionen, so dass der Verlust einer ANC-1-homologen Isoform mit beiden spezifischen, terminalen Domänen (CH und KASH) keine Letalität verursacht. Allerdings ist auch der Funktionsverlust der KASH-Domäne von Syne-1 oder Syne-2 in entsprechend defizienten Mäusen nicht letal, obwohl im Fall von Syne-1 eine deutliche Mislokalisierung von Zellkernen in Skelettmuskeln auftritt. Erst ein Doppel-Knockout der KASH-Domänen beider Syne-Gene führt zu Letalität (Zhang et al., 2007). Es ist daher möglich, dass Msp-300 eine Funktion bei der Kernlokalisierung (z.B. in Skelettmuskeln) hat, aber dass die Msp-300-gesteuerte, korrekte Lokalisation der Zellkerne nicht essentiell für die Lebensfähigkeit ist.

Obwohl die KASH-Domäne namensgebend für die Proteinfamilie ist, sind in vielen Fällen bedeutende Funktionen für Isoformen ohne KASH-Domäne beschrieben worden, die nichts mit der Lokalisierung von Zellkernen zu tun haben. Besonders gut untersucht ist die Funktion KASH-loser Isoformen von Klar, die statt der KASH-Domäne eine so genannte LD (lipid droplet)-Domäne besitzen, die Lipid-Vesikel bindet (Guo et al., 2005). Diese Isoform wird für den geregelten Transport von Lipid-Vesikeln im frühen Embryo benötigt, indem über Dynein eine Verknüpfung der Vesikel mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett hergestellt wird (Welte et al., 1998). Dabei ist der N-Terminus von Klar nicht allein für die Verknüpfung mit Dynein verantwortlich, sondern spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Regulation von Motorproteinen (Gross, 2003; Gross et al., 2000; Jackle and Jahn, 1998; Welte, 2004). Auch KASH-lose Isoformen von Syne-1 sind beschrieben worden, die eine bedeutende Rolle bei der postsynaptischen Endocytose (Cottrell et al., 2004) spielen. Ob für die Funktion von Syne-1 bei der Organisation der Kernmatrix die KASH-Domäne eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005). Auch für eine ganze Reihe weiterer Funktionen von KASH-Familien Proteinen, die keine offensichtliche Involvierung des Zellkerns zeigen, ist die Bedeutung der eigentlichen KASH-Domäne unklar. So hat zum Beispiel Klarsicht auch eine Rolle bei dem polarisierten Wachstum von Membranen während der Entwicklung der Speicheldrüse (Myat and Andrew, 2002). Auch die Funktionen von Syne-1 bei der Organisation des Golgi-Apparates (Beck, 2005; Gough and Beck, 2004; Gough et al., 2003) oder bei der Kinesin-abhängigen Kontrolle der Cytokinese (Fan and Beck, 2004) benötigen möglicherweise keine KASH-Domäne, da eine Syne-1-Isoform identifiziert worden ist, die sowohl eine Golgi-, als auch eine Kinesin-bindende Domäne, aber keine KASH-Domäne besitzt. Schließlich hat auch ANC-1 eine Funktion neben der Kernverankerung, nämlich die Verankerung und die Kontrolle der Form von Mitochondrien (Hedgecock and Thomson, 1982; Starr and Han, 2002). Auch hier ist bisher nicht geklärt, ob dabei die KASH-Domäne eine Rolle spielt.

Alle diese Beispiele verdeutlichen, dass die Kontrolle der Kernlokalisierung nur eine von vielen Funktionen der unterschiedlichen KASH-Protein-Isoformen ist. Die KASH-vermittelte

Verknüpfung mit verschiedenen Cytoskelett-Elementen stellt möglicherweise lediglich einen Sonderfall dar.

Um die zellulären Funktionen von Msp-300 in Detail zu untersuchen, ist zunächst eine Analyse der tatsächlich exprimierten Protein-Isoformen notwendig. Außerdem wird die Generierung weiterer Mutationen, die spezielle Isoformen betreffen, eine bedeutende Rolle spielen. Die von uns generierten, molekular definierten Deletionsallele bieten jedoch vorerst einen guten Ansatzpunkt für die funktionale Untersuchung von *Msp-300*. Dabei ist zunächst die detaillierte Untersuchung des Muskelsystems in *Msp-300*-defizienten Larven ein guter Ausgangspunkt. Allerdings ist dazu, wie bereits angedeutet, eine gewisse Expertise notwendig, da es sich höchstwahrscheinlich um einen sehr schwach ausgeprägten Phänotyp handelt.

2.3.4 Der in *Msp-300^{sz75}*-mutanten Eikammern beobachtete Dumping-Phänotyp

Wie bereits erwähnt, wird der in *Msp-300^{sz75}*-mutanten Eikammern beobachtete Dumping-Phänotyp höchstwahrscheinlich nicht durch das *Msp-300^{sz75}*-Allel, sondern durch eine bisher nicht identifizierte Mutation auf Chromosomenarm 2L hervorgerufen, im Folgenden *sz75* genannt. Ein Dumping-Phänotyp wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen verursacht (Spradling, 1993). Die meisten Dumping-Mutationen beeinflussen das Aktin-Cytoskelett (Hudson and Cooley, 2002; Mahajan-Miklos and Cooley, 1994a; Robinson and Cooley, 1997). Ausnahmen davon sind Mutationen, die einen Defekt bei der Nährzell-Apoptose verursachen, welche für die Initiation des Dumping-Prozesses essentiell ist (*dcp-1* (McCall and Steller, 1998)), sowie Mutationen, die die Kontraktion der Nährzellen beeinträchtigen, welche die primäre Grundlage für den Transfer des Nährzell-Cytoplasmas während des Dumpings ist (*spaghetti-squash* (Edwards and Kiehart, 1996; Wheatley et al., 1995)). Die Beobachtung, dass in *sz75*-mutanten Eikammern Nährzell-Kerne und -Cytoplasma in die Oocyte gepresst werden, zeigt jedoch, dass der Dumping-Prozess initiiert wird und dass die kontraktile Kräfte in den Nährzellen nicht beeinträchtigt sind.

Aktin-abhängige Dumping-Phänotypen treten entweder als Folge eines generellen Defekts des gesamten Aktin-Cytoskeletts auf (z.B. *armadillo* (Peifer et al., 1993)), oder als Folge eines spezielleren Defekts bei der Bildung der Ringkanäle (*kelch*, *cheerio*; *Src64* (Dodson et al., 1998; Kelso et al., 2002; Robinson and Cooley, 1996; Robinson et al., 1997; Xue and Cooley, 1993)) oder der cytoplasmatischen Aktinbündel innerhalb der Nährzellen (*singed*, *quail*, *chickadee* (Bryan et al., 1993; Cant et al., 1994; Cooley et al., 1992; Guild et al., 1997; Mahajan-Miklos and Cooley, 1994b; Matova et al., 1999; Rittenhouse and Berg, 1995)). Ein genereller Effekt der *sz75*-Mutation auf die Organisation des Aktin-Cytoskeletts kann ausgeschlossen werden, da homozygot mutante Fliegen neben dem Oogenese-Phänotyp keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten zeigen. In Bezug auf den Dumping-Phänotyp konnten wir außerdem in allen Fällen, in denen die Membran einer Nährzelle vollständig intakt war, cytoplasmatische Aktin-Bündel innerhalb der Nährzellen finden, die in Organisation und Aufbau von Wildtypischen nicht zu unterscheiden waren. Desorganisierte Aktin-Bündel traten ausnahmslos in Nährzellen mit defekten Membranen auf. In Phalloidin-

Färbungen erscheinen außerdem alle Ring-Kanäle zunächst korrekt angelegt zu werden; dasselbe ist auch in Antikörperfärbungen gegen htsRC, einem spezifischen Ringkanal-Marker, beobachtet worden (Yu et al., 2006). Auch hier korreliert der später beobachtete Verlust von Ring-Kanälen mit dem Auseinanderbrechen der Nährzellmembranen. Um einen Effekt auf die Struktur und Funktion der Ringkanäle ausschließen zu können, ist jedoch eine detailliertere Analyse notwendig. Möglicherweise liegt die primäre Ursache für den Dumping-Phänotyp im Fall von *sz75* aber auch in dem Zusammenbrechen der Nährzellmembranen. Bevor der *sz75* Dumping-Phänotyp im Detail analysiert wird, ist es jedoch sinnvoll, zunächst die zugrunde liegende Mutation zu identifizieren. Als Folge der von uns durchgeführten Defizienz-Kartierung der Dumping-Mutation reduziert sich der genomische Bereich, in dem die Mutation liegt, auf die Lücken, die durch die verfügbaren Defizienzen nicht abgedeckt werden, also auf ungefähr 5% von Chromosomarm 2L. Allerdings sollten vor einer weiteren Feinkartierung der Mutation mit Konzentration auf diese Bereiche die Ergebnisse der Defizienzkartierung durch eine grobe Rekombinationskartierung mit phänotypischen oder molekularen Markern verifiziert werden, um zu überprüfen, ob sich der Dumping-Phänotyp überhaupt kartieren lässt. Es ist beispielsweise denkbar, dass es sich um einen synthetischen Phänotyp (Guarente, 1993; Lucchesi, 1968) handelt, der nur auftritt, wenn zwei unabhängige Mutationen gleichzeitig homozygot vorliegen.

Obwohl wir, aufgrund der normalen Oogenese bei Funktionsverlust von *Msp-300* und der Tatsache, dass der Dumping-Phänotyp durch die *Msp-300* Duplikation nicht gerettet werden kann eine Rolle von *Msp-300* bei der Generierung des Dumping-Defekts in *sz75*-homozygoten Ovarien weitgehend ausschließen, möchte ich abschließend auf eine, wenn auch sehr unwahrscheinliche Möglichkeit der Beteiligung des *Msp-300^{sz75}*-Allels an diesem Phänotyp eingehen. In seltenen Fällen sind so genannte rezessive Funktionsgewinnmutationen (gain-of-function-Mutationen) beschrieben worden, wie zum Beispiel für das *torso*-Allel *tor^{RL3}* (Klingler et al., 1988; Strecker et al., 1989). Dabei handelt es sich um neomorphe Allele, die erst bei homozygotem Vorliegen zu einem gain-of-function-Phänotyp führen. Da sich jedoch normalerweise, wie zum Beispiel auch für das genannte *tor^{RL3}*-Allel, der mutante Phänotyp durch eine zweite Kopie des Wildtyp-Allels retten lässt (Klingler et al., 1988), ist auch diese Möglichkeit im Falle des *Msp-300^{sz75}*-Allels extrem unwahrscheinlich. Wir können jedoch nicht vollständig ausschließen, dass der Dumping-Phänotyp auf einem Dosis-abhängigen Effekt einer rezessiven gain-of-function-Mutation zurückgeht, der erst zum Tragen kommt, wenn zwei Kopien des mutanten Allels vorliegen und der unabhängig von der Zahl der Wildtypkopien des Gens auftritt. Auch dieser sehr spezielle Fall lässt sich jedoch vermutlich im Rahmen einer Rekombinationskartierung klären, weil sich dadurch das *Msp-300*-Allel und die den Dumping-Phänotyp verursachende Mutation trennen lassen sollten, falls es sich um zwei unabhängige Mutationen handelt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Reagenzien und Ausrüstung

Wenn nicht anders angegeben wurden Standardreagenzien und allgemeiner Laborbedarf der folgenden Firmen verwendet:

- Generelle Reagenzien/Chemikalien: Amersham, Boehringer, Fluka, Gibco BRL, Invitrogen, Merck, NEB, Qiagen, Promega, Roche, Roth und Sigma
- Plastik-Laborbedarf: Eppendorf, Falcon, Roth, Sarstedt

3.1.2 *Drosophila melanogaster* Fliegenstämme

Abkürzungen:

BL: Bloomington Stock Center, Indiana University

SSR: Stammsammlung AG Siegfried Roth

EX: Exelixis stock collection, Harvard Medical School

VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center

Genotyp	Stamm-Nummer/Quelle
w[1118]	BL 6326
w, Gla / CyO; MKRS / TM2	SSR
pipLacZ / pipLacZ; Sb/TM3ser	Dave Stein, University of Texas, Austin
pipC14/TM3	Dave Stein, University of Texas, Austin
Df(3L)A13/TM6B	Dave Stein, University of Texas, Austin
grk HF48 cn bw/ CyO	SSR
grk HK36, cn bw sp/ CyO	SSR
y1 w67c23; P{SUPor-P}Msp-300[KG01198]	BL 13707
Msp-300 [sz75]/CyO	Günter Reuter, Martin Luther Univ., Halle
Df emcE12/TM6c,sb (klar Def)	Michael Welte, Univ. of Rochester
klar mBX12	Michael Welte, Univ. of Rochester
klar delta1-18	Michael Welte, Univ. of Rochester
klonale Analyse mittels FLP/FRT System:	
w+; LacZ; pntD88 FRT82B/ SM6a-TM6B	Matthew Freeman, MRC Lab. of Mol.Biol., Cambridge
yan [XE18] FRT 40A/CyO	Matthew Freeman, MRC Lab. of Mol.Biol., Cambridge
LacZ; pnt [delta 88] FRT82B/ SM6a-TM6B	Antonio Baonza, Universidad Autonoma de Madrid
ttk [1e11] FRT 82B / TM6B	Antonio Baonza, Universidad Autonoma de Madrid
Df(2R) γ 27, cn/ CyO	Tien Hsu, Med.I Univ. of South Carolina, Charleston
FRT 40A Df(2R) γ 27, cn/ CyO	SSR
FRT82B fetU6/TM3, Sb	Donald Morisato, Evergreen State College, Olympia
FRT 82B gro E48/TM3	Ze'ev Paroush, Hebrew University, Jerusalem
FRT 82B CtBP P1590/TM3	Ze'ev Paroush, Hebrew University, Jerusalem
tkv a12 FRT 40A (neo)/CyO	Matthew Freeman, MRC Lab. of Mol.Biol., Cambridge
w; Med 13 FRT 82B (w+)/TM3 sb	Manfred Frasch, Friedrich-Alexander Univ., Erlangen

y[1] w[1118]; P{Car20y}25F P{neoFRT}40A	BL 1816
yw[hsflp]; lf/CyO; 82B GFP FRT/TM6 tb	Stefan Luschnig, Universität Zürich
hsflp ; lf ; +/SM6-TM6	SSR
Gal4-Treiberlinien:	
w; Cy2-Gal4	SSR
w; ; P{GAL4::VP16-nos.UTR}/TM6	Ruth Lehmann, New York University Medical Center
w[1118]; P{mat α 4-GAL-VP16}V2H/CyO	BL 7062
Exelixis-Insertionen:	
PBac{WH}f05524 (3' Msp-300)	EX
PBac{RB}e04257 (3' Msp-300)	EX
P{XP}d07495 (5' Msp-300)	EX
P{XP}d07933 (5' Msp-300)	EX
P{XP}d10678 (5' Msp-300)	EX
PBac{PB}c03240 (5' Msp-300)	EX
PBac{RB}e04156 (5' Msp-300)	EX
PBac{WH}f05156 (in Msp-300)	EX
PBac{PB}c06031 (in Msp-300)	EX
P{XP}d09701 (in Msp-300)	EX
PBac{RB}e00938 (in Msp-300)	EX
PBac{WH}f00429 (in Msp-300)	EX
PBac{WH}f02461 (in Msp-300)	EX
P{XP}d01980 (3' CG18584)	BL 19169
PBac{WH}f07700 (3' CG18584)	EX
CG3287 [P9967] (5' CG18584)	BL
P{XP}d06841 (5' CG18584)	EX
CG3287[EY03560] (5' CG18584)	BL 2000
PBac{WH}f00899 (5' CG18584)	EX
Deletionen:	
w1118; Df(2L)Exel6011, P{XP-U}Exel6011/CyO	BL 7497
Df(2L)BSC109	BL 8674
Df(2L)sc19-1	BL 615
Df(2L)tkv3	BL 1164
Dumping-Allele auf Chr 2L:	
y[1] w[67c23]; qua[EY03072]	BL 19665
qua[6-396]/SM1	BL 4571
qua[8-1062]/SM1	BL 4572
w[*]; kel[DE1] cn[1]/CyO	BL 4893
y[1] w[67c23]; kel[KG03947]	BL 13269
y[1] w[67c23]; chic[EY13121]/CyO	BL 21408
P{ry[+t7.2]=A92}chic[11]/CyO; ry[506]	BL 2201
y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}chic[k13321]	BL 11087
chic[01320] cn[1]/CyO; ry[506]	BL 4891
Bloomington Deficiency-Kit für Chr 2L:	
Df(2L)net-PMF	BL 3638
Df(2L)BSC4	BL 6283
Df(2L)BSC106	BL 8672
Df(2L)BSC16	BL 6608
Df(2L)ast2	BL 3084
Df(2L)dp-79b	BL 3133
Df(2L)BSC37	BL 7144
Df(2L)dpp[d14]	BL 6648
Df(2L)C144	BL 90

Df(2L)JS17	BL 1567
Df(2L)BSC28	BL 6875
Df(2L)BSC31	BL 6965
Df(2L)drm-P2	BL 6507
Df(2L)ed1	BL 5330
Df(2L)sc19-8	BL 693
Df(2L)ED250	BL 9270
Df(2L)BSC110	BL 8835
Df(2L)BSC109	BL 8674
Df(2L)Exel6011	BL 7497
Df(2L)cl-h3	BL 781
Df(2L)E110	BL 490
Df(2L)BSC5	BL 6299
Df(2L)BSC6	BL 6338
Df(2L)BSC7	BL 6374
Df(2L)spd[j2]	BL 2414
Df(2L)Dwee1-W05	BL 5420
Df(2L)XE-3801	BL 4956
Df(2L)BSC41	BL 7147
Df(2L)BSC142	BL 9502
Df(2L)Trf-C6R31	BL 140
Df(2L)TE29Aa-11	BL 179
Df(2L)BSC111	BL 8836
Df(2L)ED611	BL 9298
Df(2L)N22-14	BL 2892
Df(2L)BSC17	BL 6478
Df(2L)Mdh	BL 1045
Df(2L)BSC50	BL 8469
Df(2L)J2	BL 3366
Df(2L)BSC143	BL 9503
Df(2L)BSC32	BL 7142
Df(2L)BSC145	BL 9505
Df(2L)BSC36	BL 7143
Df(2L)FCK-20	BL 5869
Df(2L)Pri	BL 3079
Df(2L)BSC30	BL 6999
Df(2L)BSC159	BL 9594
Df(2L)b87e25	BL 3138
Df(2L)BSC147	BL 9506
Df(2L)TE35BC-24	BL 3588
Df(2L)r10	BL 1491
Df(2L)cact-255rv64	BL 2583
Df(2L)TW137	BL 420
Df(2L)pr-A16	BL 567
Df(2L)TW161	BL 167
Df(2L)Exel6049	BL 7531
Df(2L)BSC151	BL 9510
Df(2L)C'	BL 4959
VDRRC pUAST-RNAi-Stämme:	
w; UAS-NFAT-RNAi 30566	VDRRC
w; ;UAS-CG12942-RNAi 32127	VDRRC
w; ;UAS-CG12942-RNAi 32128	VDRRC
UAS-E(bx)-RNAi 46645	VDRRC

w; UAS-mbf1-RNAi 12751	VDR
w; ; UAS-mbf1-RNAi 12752	VDR
w; ; UAS-CG4936-RNAi 6252	VDR
w; UAS-CG4936-RNAi 6253	VDR
w; ; UAS-apt-RNAi 4289	VDR
w; ; UAS-lolal-RNAi 9571	VDR
w; ; UAS-lolal-RNAi 9572	VDR
w; UAS-lolal-RNAi 9573	VDR
w; ; UAS-CG6770-RNAi 35824	VDR
w; UAS-CG6770-RNAi 35825	VDR
w; UAS-Ssdp-RNAi 28608	VDR
w; UAS-Ssdp-RNAi 28610	VDR
w; ; UAS-CG8273-RNAi 28885	VDR
w; UAS-CG8273-RNAi 28887	VDR
Im Rahmen dieser Arbeit selbst generierte Fliegenstämme:	
w; Gl ₁ /CyO; 3000-us-pip-GFP/TM2	selbst hergestellt
w; Gl ₁ /CyO; 3000-us-pip-LacZ/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1150-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1135-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1100-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1050-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1000-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 500-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 2000-3000-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 570-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 670-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 800-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 850-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 900-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 950-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 975-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 985-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1000-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1050-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1100-1300-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-ΔA-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-ΔB-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-ΔC-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutA-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutB-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutC-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutD-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutE-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutF-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1500-mutG-us-pip-LacZ/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 3kb-usPip:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 3kb-usPip-Hsp70:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; Gl ₁ /CyO; 3kb-usPip:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; Gl ₁ /CyO; 3kb-usPip-Hsp70:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; 1kb-usPip:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1kb-usPip-Hsp70:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt

w; Gla/CyO; 1kb-usPip:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO; 1kb-usPip-Hsp70:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; 1000-usPip:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1000-usPipHsp70:pipST2/CyO;MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO; 1000-usPip:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO; 1000-usPip-Hsp70:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; 1100-usPip:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; 1100-usPip-Hsp70:pipST2/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO; 1100-usPip:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO; 1100-usPip-Hsp70:pipST2/TM2	selbst hergestellt
w; pUASp-Msp300-KASH-GFP/CyO;MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO;pUASp-Msp-300-KASHGFP/TM2	selbst hergestellt
w; pUASmGFP6-Msp300-ABD/CyO;MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO;pUASmGFP6-Msp-300-ABD/TM2	selbst hergestellt
w; tub-Msp-300-ABD-GFP/CyO; MKRS/TM2	selbst hergestellt
w; Gla/CyO; tub-Msp-300-ABD-GFP/TM2	selbst hergestellt
w; Df(2L)Msp-300-compl/CyO, Kr-GFP	selbst hergestellt
w; Df(2L)Msp-300-5'/CyO, Kr-GFP	selbst hergestellt
w; Df(2L)Msp-300-3'/CyO, Kr-GFP	selbst hergestellt
w; FRT 40A, Df(2L)Msp-300-compl/CyO	selbst hergestellt
w; FRT 40A, Df(2L)Msp-300-5'/CyO	selbst hergestellt
w; FRT 40A, Df(2L)Msp-300-3'/CyO	selbst hergestellt
w; Df(2R)d06841-f07700/CyO	selbst hergestellt

3.1.3 Antikörper und fluoreszente Marker

Primäre Antikörper:

Maus anti-Lamin T40 ((Buchenau et al., 1997), 1:400),
Maus anti-Phosphotyrosin (clone PY-20, Sigma, 1 : 200)
Meerschweinchen anti-Msp-300 ((Volk, 1992), 1:500),
Maus anti-Klar-C ((Guo et al., 2005), 1:5),
Kaninchen anti-beta-Galactosidase (cappel, 1 :100, präabsorbiert an w^{1118} -Ovarien),
Maus anti-beta-Galactosidase (Promega, 1 : 1000),
Maus anti-GFP (Roche, 1 :500),
Kaninchen anti-GFP (Molecular Probes, 1 : 200, präabsorbiert an w^{1118} -Ovarien),
Schaf anti-DIG-alkalische Phosphatase (Roche, 1 : 2000)
Schaf anti-DIG-HRP (Boehringer, 1 : 50)
Kaninchen anti CF2 ((Mantrova and Hsu, 1998), 1 : 2000)
Ratte anti-Cic ((Goff et al., 2001), 1 : 500; erhalten von Gerardo Jiménez, IBM Barcelona)

Sekundäre Antikörper:

Alexa 555-konjugiert Ziege anti-Maus IgG (*Molecular Probes*, 1:400),
Alexa 555-konjugiert Ziege anti-Kaninchen IgG (*Molecular Probes*, 1:400),
Alexa 555-konjugiert Ziege anti-Meerschweinchen IgG (*Molecular Probes*, 1:400),
Alexa 555-konjugiert Ziege anti-Ratte IgG (*Molecular Probes*, 1:400),
Alexa 488-konjugiert Ziege anti-Maus IgG (*Molecular Probes*, 1:400),
Alexa 488-konjugiert Ziege anti-Kaninchen IgG (*Molecular Probes*, 1:400),

Außerdem wurden folgende fluoreszente Marker eingesetzt:

Rhodamin-gekoppeltes Wheat Germ Agglutinin (MoBiTec, 1:2500),
 FITC-gekoppeltes Phalloidin (Molecular Probes, 1:250),
 Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin (Molecular Probes, 1:250),
 DAPI (Roche, 1:2000)

3.1.4 Oligonukleotide / PCR-Primer

Alle Oligonukleotide wurden von *Sigma Aldrich* oder *Eurogentec* synthetisiert. Das lyophilisierte Pellet wurde in Wasser in einer Konzentration von 50pmol/µl aufgenommen und diese Stammlösung bei -20° C gelagert. Für den Einsatz in PCR-Reaktionen wurden Aliquots mit einer Konzentration von 5pmol/µl angesetzt.

Pipe-Reporter-Gen-Konstrukte	
interne Deletions-Konstrukte (fusion PCR):	
<u>Oligo-Name</u>	<u>Sequenz</u>
PiRpUs	CGAATTTAAGCGTTTACCCA
PiRpUsApp	ACTGTAAGTACTGACTTGTCCACCGAATTTAAGCGTTTACCCA
Pi6D	GTGGACAAGTCAGTTACAGTGAG
Pi6DApp	TGGGTAAACGCTTAAATTCGGTGGACAAGTCAGTTACAGTGAG
PiRpBUs	CAATTGCAAAAAAATGGAAAAAC
PiRpBUsApp	CAGCAACAAGTTGAAAATCAATTGCAAAAAAATGGAAAAAC
PiRpBDs	ATTTTCAACTTGTGGCTG
PiRpBDsApp	TTCCATTTTTTTGCAATTGATTTTCAACTTGTGGCTG
PiRpCUs	TTGTGTTTATCTGGTAAT
PiRpCUsApp	AAGTAAAATTTAAACGAAATTTGTGTTTATCTGGTAAT
PiRpCDs	ATTTTCGTTTTAATTTTACTTTT
PiRpCDsApp	ATTACCAGATAAACACAAATTTTCGTTTTAATTTTACTTTT
terminale Deletions-Konstrukte:	
1,3kbUsPip_Lo	GCAATAGGCAGCAACTTTACA
1050UsPip_Lo	TTGTTCGGTCCTAAAAATGTGG
1100UsPipLo	CCGGAATTCGGCAATTGTAATCGAGAAATTTACACG
1115UsPipLo	CCGGAATTCGGTTTTGCAATTGTTATCGAGAAATTTAC
1125UsPipLo	CCGGAATTCGGTTTTCCATTTTTTTGCAATTGTTATCG
1135UsPipLo	CCGGAATTCGGAGGCTGGCGTTTTTCCATTTTT
1150UsPip_Lo	TTTTATGTTGAGGCTGGCGTTTTT
1200UsPipLo	CCGGAATTCGGTAAACACAAGACATGTGCCGCCA
170Us-Bam	CGCGGATCCGCGTTAGCAAATTCGGGATCTAA
270Us-Bam	CGCGGATCCGCGCTAAGCTCATTGACCCTTATTC
2kbD-Bam	CGCGGATCCGCGAGCTTTTTTTGGCGAATGAGT
2kbD-Eco	CCGGAATTCGGAGCTTTTTTCCGCTTACACA
3End-Bam	CGCGGATCCGCGTTTATTTAAAAACTAGTTATTTTA
3End-Eco	CCGGAATTCGGTTTTATTTAAAAACTAGTTATTTTA

400Us-Bam	CGCGGATCCGCGAGGTACGAATTTTTTAATTTACGAG
450Us_Bam	CGCGGATCCGCGTATACCTTTACTCTTTTATTTAAGTGTGTC
5,5D-Eco	CCGGAATTCGCGCTAATTCTCCCTTCTCTATGAAG
5,5UBam	CGCGGATCCGCGCTTCATAGAGGAAGGGAGAATTAGAAT
500Us_Bam	CGCGGATCCGCGATCTTTTTCAGGTACCTTAACTTTTAAC
550Us_Bam	CGCGGATCCGCGCACTAACTGGCGTCAGACGGCTG
565UsBam	CGCGGATCCGCGCTGACTTGTCCACTAACTGG
575UsBam	CGCGGATCCGCGCGGCTGTGCAATTTAAGCGT
585UsBam	CGCGGATCCGCGCTGTGCAATTTAAGCGTTTACCCA
5end-Bam	CGCGGATCCGCGCCCGATTTTCATTTCTTTTACCG
5End-Eco	CCGGAATTCGCGCCCGATTTTCATTTCTTTTACCG
6,5D-Eco	CCGGAATTCGCGCAACATATTGTGAGCGACCACAATT
6,5kbUBam	CGCGGATCCGCGGCTGTCCAATTGTGGTCGCTCAC
600Us_Bam	CGCGGATCCGCGCCGCATAGGTCCACATTTTTAGGAC
620UsBam	CGCGGATCCGCGCCGCATAGGTCCACATTTTTAGGA
625UsBam	CGCGGATCCGCGCCACATTTTTAGGACCGACAAAAAACT
650Us_Bam	CGCGGATCCGCGTTATTAACTTTTTTTTATTTTACGCAACAAG
6D-Eco	CCGGAATTCGCGGTGGACAAGTCAGTTACAGTGAG
6kbUBam	CGCGGATCCGCGCTCACTGTAAGTACTGACTTGTCCACT
7,5D-Eco	CCGGAATTCGCGGCCCGCATCCGGGCAGCAATC
7,5kbDEco	CCGGAATTCGCGATCCGGGCAGCAATCGGTGG
7,5kbUBam	CGCGGATCCGCGCGAGGATGTCCACCGATTGCTGCC
700Us_Bam	CGCGGATCCGCGTCGATAACAATTGCAAAAAAATGG
7D-Eco	GGACCGGAAATCGCTAACGAGGCGT
7kbDEco	CCGGAATTCGCGGACCGGAAATCGCTAACGAGGCG
7kbU-Eco	CCGGAATTCGCGACTAGTGATTAGTTTGATAAGCT
delta1D-Bam	CGCGGATCCGCGCGTAAGGCCCAACTCACTTG
delta1D-Eco	CCGGAATTCGCGCGTAAGGCCCAACTCACTTG
delta2D-Bam	CGCGGATCCGCGCGCCTGGCCATCGGAAATGG
delta2D-Eco	CCGGAATTCGCGCGCCTGGCCATCGGAAATGG
ExD-Bam	CGCGGATCCGCGGTAAGTGTGGTCTTCAGCCG
ExD-Eco	CCGGAATTCGCGGTAAGTGTGGTCTTCAGCCG
ExU-Bam	CGCGGATCCGCGCGATCGCGGCTTGACTGAAT
ExU-Eco	CCGGAATTCGCGCGATCGCGGCTTGACTGAAT
interne Mutations-Konstrukte (fusion PCR):	
MutAfv	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutAfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutArev	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutArevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutBfv	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutBfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutBrev	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutBrevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutCfv	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutCfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutCrev	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC

MutCrevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutDfv	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutDfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutDrev	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutDrevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutEfv	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutEfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutErev	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutErevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutFfv	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutFfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutFrev	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutFrevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutGfvPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
MutGrevPI	TGATGGTGGACCAGGGGCCTGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGC
Klonierung <i>pipe-rescue</i>-Konstrukte:	
5eHspPr_Bam	CGCGGATCCGCGGAGCGCCGAGTATAAATAGAG
3eHspPr_Bam	CGCGGATCCGCGCTGCAGATTGTTTAGCTTGTTTCAG
Sequenzierung <i>pipe</i>-ST2-cDNA:	
pip13	ATCGCCGAGCTCTACGGACG
pip501	CCATGCATCTGAACAATA
pip1001	AAAAGACAGACCCTTTAC
pip1372	TTAGTGAAGATTGTTCTC
pip872	TGCGCCTATATATAGCTC
pip361	CTGCAGCTTCACCTCCAT
Sequenzierung <i>pipe</i>-Promotor-Region:	
sq462	CACATTTAGCCTGGTTTCTT
sq930	GACCATGCTCAATGACTTTG
sq1410	TGTCCACACAGCCATAACCG
sq2440	GCTGAGAAAGGCGCACAGAAG
sq2850	CGCCGAGTTATTTAAGCAAAAC
sq3540	GAAAAGCAAATTCTCACACCCT
sq3990	GAAGTGAGCTGCGCTTTTGT
sq7630	GGAACATCGAACGAGATGCT
sq7200	GGAGGGATCTACCTTGAATGTATTTTG
sq6730	GTGTTTGCACCTAGGGCCAAT
sq6320	GTTTTTATGTTGAGGCTGGCG
sq5870	TTGTGGACAGCAAGTGGGGA
sq5410	AGATTAATGTCAGATGTGGGG
sq4440	AGATGGGTTTATGTAGATCGACGAG
Oligos für Klonierung Yeast One-Hybrid screen Konstrukt:	
mluNY1Heco	CGCGTTCGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGCAAAATCGTGTAAATTTCTCGATAAC AATTGCAAAATCGTGTAAATTTCTCGATAACAATTGCAAAA
ecoNY1HmluRC	AATTTTTTGCAATTGTTATCGAGAAATTTACACGATTTTGCAATTGTTATCGAGAAA TTTACACGATTTTGCAATTGTTATCGAGAAATTTACACGA
Oligos für EMSA:	

MT_NY1Hmut	GATGTGCCCGGGAGATCGCCACCGGTACCCC
MT_NY1HmutRC	GGGGTACCGGTGGCGATCTCCCGGGCACATC
MT_NY1H	TCGTGTAATTTCTCGATAACAATTGCAAAA
MT_NY1Hrevc	TTTTGCAATTGTTATCGAGAAATTTACACGA
Klonierung Msp-300-GFP-Fusionsproteine:	
newABD5e	GAGCAAGAACGTGTGCAGAAG
newABD3e	CTGGAAGACCACCTTCTCCTT
ABD3eXba	CTAGTCTAGACTAGATATGTCATGATACTCTTCTC
ABD3eNot	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATATGTCATGATACTCTTCTC
ABD5eBam	CGCGGATCCGCGAGCAAGAACGTGTGCAGAAG
KASH-5e-BgIII	GGAAGATCTTCCCAACACCGATGGCGGCGATGCT
KASH-3e-NotI	AAGGAAAAAAGCGGCCGCAGATCGTGTTCATTGCACTAAT
Test-Primer Exelixis-Insertionen/Deletionen:	
WH3eOut	CCTCGATATACAGACCGATAAAAC
RB3emIN	TGCATTTGCCTTTTCGCCTTAT
XP5eOutLo	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG
XP5eInUp	AATGATTCGCAGTGGAAGGCT
XP3eOutUp	TACTATTCTTTCACTCGCACTTATTG
XP3eInLo	CAATAAGTGCGAGTGAAAGGAATAGTA
MSP-abd5inner	TTTATACGTGTTCCACCGCTTCGCA
MSP-abd3outer	CTCTTCTCGTCCGGCTTGGGTACGTC
kash3e-inner	GCAACTCGACAGCTTTACGTGG
kash5e-outer	CCGCACCCAACACAGAAAATGC
3eMspLo	TTGGCTAAGCTGGCTAAATGAATA
3eNesLo	AAGGGAACGGTTTTAGTAGCAT
neu3eMspUp	GGTCAAGGCCAAGTCGCAGAGC
neuUsMspUp	TAGCGCAACAGGATAGAAAGGTG
neuUsMspLo	CTCGCATGCTTCACTTTATTCTGG
neu5eMspUp	ATCCGCATCCATATCCGCAACAG
neu5eMspLo	CTTGACGTACATTTGCTGCCTTAT
neuNes3eUp	GTCCGAGCTTCCGCATCTGG
2upUsMspUp	TGCAGCAGAAGGAGGAGGATTT
1upUsMspUp	ATTCGGTTTTTGTATTAGTT
1dsUsMspUp	TCTGCTGTCATCACTACTGTCAAT
2dsUsMspUp	TTTTGGACGGGACTATGGGATTTA
2us3eMspUp	GAGCACATAGCCCAAACGGAACA
1us3eMspUp	ATGGGACCAATGTGAACGCAAGAT
2ds3eMspLo	TAATGGTTGTAATAGTGGTCGTGT
2us3eNesUp	ATAGGCCCTGCGTTAATCTGTAG
1us3eNesUp	CTGTTGAAAATGATAAAGCGTGTG
1ds3eNesLo	TTGTAAGTGCCTAATGAGATGATGC
2ds3eNesLo	CGCCGCATTCAGTCCCTTTTTTC
UsDf6011Up	TCTTTCCGGCTCTTTTCTACACA
DsDf6011Lo	AATCCCCGCTTAGCCCCAAAAA
dsDf6011b	TCGTTGGAGCTGCCGTTCA
dsDf6011c	CAGTAGCTCTCGTCCTTCTTGTG

usd01768fw	GAATGTATCGCCTTAAGAGCAACT
dsd01768rv	TCCCAGTGTACCCGAAAATGTC
usd06841fw	ATACCCTTACCGAATACCGAGTG
dsd06841rv	TTGCCCGGGTTTTCTTACTGATAC
d06841us_b	GACCTTAAGAATCAGAACATA
d06841us_c	CTCACCCAGTTGCTCCTTTCA
usf05524fv	GGCGATGCATTACTTTGAGACTGG
dsf05524rv	AATGCCCTCTTCTTCCAGTAGC
usf07700fv	GTATCCCTGGAACACGCACAC
dsf07700rv	TTAAATTCGCTTCAAACGCACTCA
USd1768a	CGGCAACACTGTATCAAGCAACCA
USd1768b	GTTTGTTGGTTTTTGTCTGAGTGAG
USd1768c	TATTATATGTGCGAAGCCCAACT
DSf05524a	TTAAAGGAAAAATAGCAATGT
DSf05524b	GTCTTGACGTTTACATTGA
DSf05524c	TAAAATCGGATGGCCAACCTACA
MspDfTsUp	ATCCATCCTCACATTCCTT
MspDfTsLo	TCATTTAGTTTCCAGCCATCCAGT
d07933us	CATCCATCAAAAAGTGGTACG
d07933ds	AAAAGATGCGAGAATTCGGG
d07933ds_b	AAGCCACGTTGCCTCTCCTG
d07933ds_c	TCGTCTGATTCTCCTCGGTTAGTT
PCR-Produkte zur Sequenzierung des <i>Msp-300^{sz75}</i> Allels:	
MspA_fv	AGCAAGAACGTGTGCAGAAGA
MspA_rev	TGACCGCTTGGCATTATCA
MspB_fv	TGGAGGAGCACAAGCTCTTCT
MspB_rev	CGTTCTCATAGCGTTTTTGTCA
MspC_fv	TTGACGAGCTGCGTAATTTG
MspC_rev	CATCCTGAATAGTGGCCAGTT
newMspD_fv	TTGGACTATTGCTCCGACAT
MspD_rev	ATCCAGCAGATCCTCGAGCTT
MspE_fv	TAAGAACCGCCTGTTGGAAT
MspE_rev	CTCTTTCACAATTGGCAGCA
newFfv	GGTTGGCAGCGTATTTTAGA
newFrev	TGATATAAACATGAAAGCCGC
MspG_fv	GGTAAGGCCGAAATAAAAAAG
MspG_rev	AAAACAATGGCAAGCAGCGT
MspH_fv	CATCGCTCTCATTGGGAAAA
MspH_rev	TGCTTGGTTATTGTTTCGCGT
MspI_fv	ATTATCGAAGGCGAGCCCA
MspI_rev	TCGGTAGTTGTTGTTGTGGTG
MspK_fv	CGAGGAAAAGCCAATTGTTG
MspK_rev	AAACTTTCCAAAACAGACGGA
MspL_fv	TCCCAAGAAAGAAGCTCCACA
MspL_rev	TCAACAGTTGGTTCAACAACG
MspM_fv	GAAAACTAAGGTGGTGGAAAGC

MspM_rev	TCTTCTTTGGGTTCCCTCCAA
MspN_fv	AAGTGCATCCCCAATACGAA
MspN_rev	CGTGGCAACTTCTTCGATTA
MspO_fv	TTGACGGAAAGGTGGTGAG
MspO_rev	ACAAATCGATCCCTAAACGC
MspP_fv	CGCAAAGCAACTGAACGTTT
MspP_rev	TTATGCTTGCTGTGGGACTT
MspR_fv	GAGCATAAAAATTGGCTGGG
MspR_rev	TTTCATGTTCCGGCTTGTCGA
newFfv	GGTTGGCAGCGTATTTTAGA
newFrev	TGATATAAACATGAAAGCCGC
Sequenzierungs-Primer zur Sequenzierung des <i>Msp-300</i>^{sz75} Allels:	
MspA1	AGGAGCAAAGAACGTGTGC
MspA2	GACTGCATTTTGTAAAGTT
MspA3	TGCCATTAACCCGGCAAG
MspA4	CGAATTAATTTTATGAGCC
MspA5	ATTTGCGTTTACCTATTG
MspA6	GGCGATTAATTAGAAAG
MspA7	CGATGTCATGACCGGGAA
MspA8	AGTTAAATGCCTGCTCGT
MspA9	GGGTGAAAGTTTAAATTG
MspA10	GTACACTTCAATTCCAAA
MspA11	ACTGGGTGACTAATGCCT
MspA12	TGGAGAAGACCACCGAGT
MspB1	TGGAGGAGCACAAAGCTCT
MspB2	GCGCAGCTGGAACCAATT
MspB3	CGATGAGGTGGATAAGAT
MspB4	AATCCATGTTGGTGGAGA
MspB5	TTGTCCAACAAATTGGGC
MspB6	AGCTGGAGGATCTGATCG
MspB7	AACGTCAGGTCAGGATCTG
MspB8	CATCAATCGCAACGTGGA
MspB9	CGTTCAACAACGAGATCT
MspB10	GAGAAATGGACAGAGCTG
MspB11	CATTCATGACGAAGGTTT
MspB12	AGGATGCCAAGAAGGATT
MspB13	CTGCGTAATTTGTACCCA
MspC1	TTGACGAGCTGCGTAATT
MspC2	AACTGGCTGCGTGACGTT
MspC3	CCCGATAATCGCGAACGT
MspC4	ACGAGACGACATTTGAAA
MspC5	ACCCTGAAGAATCTGTGC
MspC6	GCAGAACCACAAGCTGCT
MspC7	AAGGCAAACAGAAGGATG
MspC8	GCTCTAAATGCAGCTGGA
MspC9	TGAGCTGCAGAAGGCTCA

MspC10	CAGAGTTGGTCCAGAGTT
MspC11	GATGAAACGGAGAATGCC
MspC12	TAAGTCCCAGATCGACAC
MspC13	CAAAGAAGCTGGATAAGA
MspD1	GAAAAATTGGACTATTGC
MspD2	GCCTTCCAGGCGCAAAAA
MspD3	ACCACAAACTGAACCTGT
MspD4	GAACTGCAAACCGAATGG
MspD5	CGATAACAAGCTCTGGC
MspD6	CTCTACTAACTTTGGCCA
MspD7	GAGAAGTTCCGCGTCATT
MspD8	GCAGACCTTCCTGCAGAA
MspD9	GAGAAGGATAATGTGGAG
MspD10	GGAGCTGATGACCAAGGT
MspD11	CTCAGGAGCAGATTAAC
MspD12	CAAGCTCGAGGATCTGCT
MspE1	TAAGAACCGCCTGTTGGA
MspE2	CTATCATATTTTCTTAAAACC
MspE3	CATGTGGGCAAGCTGAAT
MspE4	TAAAGTTTTGATCCTTGC
MspE5	TCGCAAGTCTCAACTCCT
MspE6	TCCACTTACCTCTGCTGA
MspE7	ACTTAGCAATGCCGATAA
MspE8	CATGAAGTACACCGATGT
MspE9	CAATGATGGTGTCAAAC
MspE10	CTGGCGGGAATACCAACA
MspE11	GTGCCACTAACTTACATA
MspE12	ACAGCTGTTGTTGTTGCT
MspE13	CAGCTGTTTGGTTGTTGT
MspF1	TACGTCAGTGCCCCATA
MspF2	AGATTCTAACTCGTGCTT
MspF3	TGTATAGAAAAATCTATA
MspF4	GCCTGGGAAAAGGCACTT
MspF5	TTCGTTTATTGTATAGCC
MspF6	TTTGTAGTACTTATCAGC
MspF7	AAAAGCTGCCAAGTCAAG
MspF8	ATGCCAAAAACAAAACAC
MspF9	CTCTCAGTCTGCTATTTT
MspF10	CATGTTGCCAGCAACATT
MspF11	ATAATATAATGTCATTCC
MspF12	GATTTTAAAGCAGAATATAGG
MspF13	AACTTTGACCAAATGAG
MspG1	GGTAAGGCCGAAATAAAA
MspG2	TATTTCCGCAGCGCCTTC
MspG3	GAGCGAACAGCAACGAGT
MspG4	TCGTCAGGTGTGTTTGT

MspG5	AGATTTATTTTGCTTGCC
MspG6	TGATATGCGTCATATGCT
MspG7	AAACTCTCTTGTAGCCAA
MspG8	CAGCTGCAGGACAAGCTA
MspG9	GTCAAGACCAACGGTCAG
MspG10	CAATCCAACACCATCACT
MspG11	TCAAGGCCAAGTCGCAGA
MspG12	TTTGAAATCGTTTTGCC
MspG13	GGCCCAAAGCATTTTGA
MspH1	CATCGCTCTCATTGGGAA
MspH2	TTGGGGCAGCTCTTGCTA
MspH3	AAAAAACCTGGTGTCTGT
MspH4	CAAACATTTCGATCCATGC
MspH5	GTATAATTTATGAGGGAG
MspH6	CGATACTCAGAACACGAC
MspH7	TGACCGAACTAGATCTCG
MspH8	GACGACAGATCCACAGCA
MspH9	TCTTGCTACTGTTGTCCA
MspH10	TCTCCACCACAAAGAACA
MspH11	TGTGGTTGAATCAGCCGT
MspH12	AGCGCCTTCGAAGAAGGA
MspH13	TGTTTTTTCAGATTCTGC
MspI1	ATTATCGAAGGCGAGCCC
MspI2	AAGGATGCTGCCATAAT
MspI3	AACTCTTCCACCTATTCA
MspI4	ACGACGCGGACTACAAAG
MspI5	GTCAATGTAATCATCGAT
MspI6	TCCGAACTAAAGCTAGAT
MspI7	GAAAATTCCGTGATTGAA
MspI8	ACTAAGCTGATCCCTGTT
MspI9	CCACCAAAGTCGGTAAGC
MspI10	GAGCCCAAAAACCAGTT
MspI11	AAGCCAGCATATGCCGGT
MspI12	GAAAAGCCAATTGTTGAA
MspI13	GAACCCAAAAAGCCAGCA
MspK1	CGAGGAAAAGCCAATTGT
MspK2	GATGATGTCAGTCAATTG
MspK3	GGGATGGTAAATCGTATG
MspK4	TCATACGGCTGTCACAAC
MspK5	GTTGCTCTGCCCGAAGAT
MspK6	ATTGATCATATGACTGAC
MspK7	GTGGAAAGAACTTATAGA
MspK8	GTGGAAGTGGAGAAGAAA
MspK9	AACCTATGAACTTCTCTG
MspK10	TGAAGTTTCTGTTGTGGA
MspK11	CCCAAGAAGGTAGTAGAA

MspK12	ATGTCTTGGACGAACCTA
MspK13	AAAGCCAATTGTTGAAGT
MspK14	AAAGATGAAGTTCTACCA
MspK15	AGCAGAATGCAGAAATTC
MspL1	TCCAAGAAAGAAGCTCC
MspL2	AGGAAAAGAAAATAAGG
MspL3	GGCCGTTGTTGAACCAAC
MspL4	GTAACGCCCGAGACACAA
MspL5	TCGTTTCTCAAACCACGG
MspL6	CTTAGAAGAAAAACCGAA
MspL7	GTTGAGTCTGCAGTTCCT
MspL8	TGACTACAGTTGTAGAAG
MspL9	ACCACTATCATGGTCGTC
MspL10	GAACCTGAAGATAAGAAA
MspL11	TCCAGAGCCCATCGTTGA
MspL12	TGAGGAACCAAGTGGTTGA
MspL13	CCCCATCGCAACCACTAT
MspL14	AGAGACTCGCTTCACGGA
MspL15	GGAAAAGAAAATAAGGT
MspM1	GAAAATAAGGTGGTGGAA
MspM2	GAAGTGACTTTTGTGAG
MspM3	AACCCACTCCAGTAAGTG
MspM4	TGTAGCAGAGGCTCTTAT
MspM5	CAACCAACCGGTGAAAGC
MspM6	AAGTTGTTAAGAAGTCTG
MspM7	TTCAAAGAAACGAAATCG
MspM8	AAGCAAAAGTCTAAGCGA
MspM9	CTGAAGAACCCAAAAAGC
MspM10	CGACGAAGAGGAACCAAGT
MspM11	GATTCCAAGTCCATTACA
MspM12	CGGAGAAGAAACCTGAAG
MspM13	GAACTTCTCAGACAGTGA
MspM14	ACCGAGACAACCTGTGTTT
MspM15	TAACGAAAGAACCGTATT
MspN1	AAGTGCATCCCCAATACG
MspN2	TGAACCCAGTAAATTGCT
MspN3	TAGCGAAGCGGAACTCGA
MspN4	AAAGTGTACCACTGGCAC
MspN5	AGCAGCAGCAGCAGAAAT
MspN6	CAGCAGCAGATCAGGGAA
MspN7	ACTTGACGTTTTAATAC
MspN8	CTCGAAAATAGTCTCCCG
MspN9	AAGCATTTATTTCGCATT
MspN10	TTATTAATCTAAGGCCGA
MspN11	GCAATCTCGAAGTACACG
MspN12	TCAAGGATCGCCAGCAGT

MspN13	CAGTTCAGGTGGTGACCA
MspN14	AGCAAGTTGTACAGCAGC
MspN15	CATCGACGGAAAGGAGCA
MspO1	TTGACGGAAAGGTGGTGA
MspO2	TATCAACGAGATTTGGCC
MspO3	AACAAAATCAAGACTGAC
MspO4	CACAGAAAACCTTCCAAA
MspO5	GATTGTGGAGGATGCCGT
MspO6	GTAGAGATTTCCAGCCAA
MspO7	CGGAACCCTATGAACTGG
MspO8	GCCAGTGCATATAACTGA
MspO9	TCTGAACAGATTAAGGAA
MspO10	ATCTGGACAAGTGGCACA
MspO11	ATCCAGTTCCTCGAGCA
MspO12	ATAGCCAACAAGTTGCAG
MspO13	CCCAGGCCATTGAACTCA
MspO14	AGGCCAAGATCTCGGTCA
MspO15	CGCAAAGCAACTGAACGT
MspP1	CGCAAAGCAACTGAACGT
MspP2	ATGTGGAGCTCTTTACGT
MspP3	TCAAGTCGCTGGAGCAGC
MspP4	TAGGTGCACATATCTTTT
MspP5	CAACTGTCATTTACACA
MspP6	GGCACTCACAGCCCTAAT
MspP7	ATTGGCCTCCATATCTCT
MspP8	TGGATATTTTGCATATGC
MspP9	ATTTCTGTTTTGCACTTC
MspP10	CACTTTTGGCCCCCTCAT
MspP11	AGCAACTGCGTCAGCTGA
MspP12	GATCATGCAGCGCAATGG
MspP13	TTGCAGCAGGAATTCCGA
MspP14	AACAGGCAGCCAAGCAGCT
MspP15	GGGCGAGGTCCTTAATCT
MspR1	GAGCATAAAAATTGGCTG
MspR2	ATCAACAGACCTCCAAAG
MspR3	CATCACGGAATGCCAGAA
MspR4	ACTCCAAAAACAACATG
MspR5	CTCCGACCTCCTGTTGTT
MspR6	AGCTCCACCCTCAAACAT
MspR7	GAACTAGAGAGATGCGAA
MspR8	CTATTAGCAAGTAATTCG
MspR9	TTTTAAATGCTCCAGAAC
MspR10	TACTACATTATCAACCTC
MspR11	CCCACGGTGAGGACTACA
MspR12	AACCTACTGAACCGAACA

3.1.5 Plasmide

pipe-LacZ:	<i>pipe</i> 5' in bluescript, 8kb der 5'-cis-regulatorischen Region von <i>pipe</i> in pBluescript ^R kloniert (Sen et al., 1998) [Karte des zugrundeliegenden pBluescript ^R -Vektors unter www.stratagene.com]
pCRR ^R 2.1-TOPO:	<i>Invitrogen</i>
pCasper-4:	(Thummel and Pirrotta, 1992), EMBL accession number: X81645
pUASp-PL:	(Rorth, 1998)
pipeST2-pBS-SK ⁺ :	<i>pipe</i> cDNA Isoform ST2 in pBluescript ^R (Sen et al., 1998)
pH-Stinger:	eGFP-Reportervektor zur Promotor/Enhancer-Analyse ((Barolo et al., 2000); GenBank Accession Number AF242365)
C4PLZ:	βGal-Reportervektor zur Promotor/Enhancer -Analyse (Wharton and Crews, 1993)
tub-GFP:	Vektor zur Klonierung N-terminaler GFP-Fusions-Proteine (erhalten von Jens Januschke, Parc Cientific de Barcelona)
pUASpmGFP6:	Vektor zur Klonierung N-terminaler GFP-Fusions-Proteine (erhalten von Andrea Brand, University of Cambridge)

3.1.6 Software

Neben den unter 3.7. aufgeführten Programmen zur bioinformatischen Analyse der *cis*-regulatorischen Region von *pipe* wurde die folgende Software sowohl auf *Macintosh* Computern (iMAC, G4), als auch auf Standart PCs benutzt:

Photoshop® CS2 (*Adobe*), Illustrator 10 (*Adobe*), Lasergene 1.62 (*DNAstar*) und Microsoft Office 2002 (*Microsoft*).

3.1.7 Mikroskopie

Als Mikroskop, sowohl für Normarski- und Fluoreszenz-, als auch für normale Durchlicht-Mikroskopie, wurde das *Axioplan 2* von *Zeiss* benutzt, ausgerüstet mit einer *HBO 100W* UV Lampe und einer *AxioCam color 412-312* Digital-Kamera. Dabei wurde die Software *Axio Vision Version 2.0.5* (*Carl Zeiss Vision GmbH*) auf einem Standart PC verwendet. Für einige Bilder wurde zusätzlich ein *Zeiss-Apotom* (*Carl Zeiss*) verwendet. Als Fluoreszenz-Stereomikroskop wurde das *Leica MZ16FA* mit der Kamera *Leica DFC490* benutzt.

Für die konfokale Mikroskopie wurde das *TCS SP2 Laser Scanning Spectral Confocal Microscope* (*Leica*) und die zugehörige *Leica Confocal Software, LCS*, (*Leica*) verwendet.

Methoden:

3.2 Arbeiten mit Fliegen

Die Haltung der Fliegen erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Ashburner, 1989; Wieschaus and Nüsslein-Volhard, 1986).

3.2.1 Keimbahn Transformation

Transgene Fliegen wurden mittels DNA-Mikroinjektion in Blastoderm-Embryos, wie bei Spradling and Rubin (Spradling and Rubin, 1982) beschrieben, hergestellt. Die Konstrukte wurden jeweils in einer Konzentration von 0.3 µg/ml zusammen mit 0.1 µg/ml $\Delta 2-3$ helper DNA (Laski et al., 1986) in Injektionspuffer (0.1 mM Phosphat Puffer [pH 7.4], 5 mM KCl) mit 2% Phenolrot injiziert.

Die geschlüpften Fliegen wurden mit w^{1118} -Balancer-Stämmen verkreuzt. In der nächsten Generation wurden Fliegen mit rötlichen Augen selektioniert und homozygote oder balancierte Stämme etabliert.

3.2.2 Genetische Mosaik-Analyse

Follikelzellklone wurden mittels der FLP/FRT-Technik generiert (Xu and Rubin, 1993). Zur Induktion der Klone wurde entweder die Follikelzell-spezifische Rekombinationskassette *e22c-Gal4*, *UAS-FLP* (Duffy et al., 1998) oder eine mittels Hitzeschock induzierbare Flipase verwendet (*hs-FLP¹²*). Im Falle der Hitzeschock-Flipase wurden adulte Weibchen 1 Stunde lang bei 37°C einem Hitzeschock unterzogen. Die Weibchen wurden anschließend mit w^{1118} Männchen verkreuzt und 2 bis 5 Tage (abhängig von der verwendeten Mutation) in frisch beheizten Röhrchen gehalten, bevor die Ovarien zur Antikörperfärbung präpariert wurden.

Die erzeugten loss-of-function-Klone waren durch die Abwesenheit von GFP markiert. Da kein Antikörper gegen Pipe zur Verfügung stand, wurde die Expression von *pipe* durch die Verwendung eines *pipe-LacZ*-Reporterkonstrukts verfolgt, welches das Gen β -Galaktosidase im wildtypischen *pipe*-Muster exprimiert (Peri et al., 2002; Sen et al., 1998). Da das ursprüngliche *pipe-LacZ*-Reporterkonstrukt nur auf dem zweiten Chromosom vorlag, wurde im Falle von mitotischen Klonen von mutanten Genen auf dem zweiten Chromosom, eine *pipe-LacZ*-Reporterlinie verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden ist (*3kb-us-pipe-LacZ*) und bei der das Reporterkonstrukt auf dem dritten Chromosom integriert ist.

Das β -Galaktosidase Protein wurde mittels anti- β -Galaktosidase Antikörperfärbung nachgewiesen.

3.2.3 Induktion von Keimbahnklonen unter Verwendung des FLP-DFS Systems

Zur Generierung von Keimbahnklonen wurde das FLP-DFS System (Chou and Perrimon, 1992; Chou and Perrimon, 1996) verwendet. Dazu wurden Fliegen generiert, die eine per Hitzeschock induzierbare Flipase trugen und die außerdem transheterozygot für die

gewünschte Mutation und das *OvoD1*-Allel, jeweils auf einem FRT-Chromosom, waren. Diese Fliegen wurden bereits als Larven (drei Tage nach Eiablage) in einem 37°C Wasserbad eine Stunde lang einem Hitzeschock unterzogen, um FRT vermittelte mitotische Rekombination zu induzieren (Xu and Rubin, 1993). Diese Hitzeschockbehandlung wurde noch an drei darauf folgenden Tagen wiederholt und die später schlüpfenden Fliegen nach 3 Tagen auf frischer Hefe analysiert, indem die Eigelege untersucht und/oder die Ovarien präpariert wurden.

3.2.4 Herstellung gezielter Deletionen unter Verwendung von *Exelixis* XP-, WH- und RB-Transposon-Insertionen

Um unter Verwendung der durch *Exelixis* zur Verfügung stehenden, FRT-tragenden Insertionen (Thibault et al., 2004) gezielte, molekular definierte Deletionen zu erzeugen, wurde wie bei (Parks et al., 2004) beschrieben vorgegangen. Allerdings stellte sich im Verlauf der Experimente heraus, dass die von *Exelixis* genannten Insertionsorte der XP-, WH- und RB-Transposons nicht immer korrekt waren. Daher wurde für alle geeigneten Insertionen zunächst der Insertionsort überprüft und bestimmt. Dazu wurden Test-Primer entworfen, die jeweils 500-1000 bp 5' und 3' des angegebenen Insertionsortes binden. Mit diesen Primern wurde dann anhand genomischer DNA der entsprechende Bereich mittels *Expand Long Template PCR System (Roche)* amplifiziert und nach Aufreinigung mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham)* sequenziert. Wenn der Integrationsort bestätigt werden konnte, wurde die entsprechende Insertion zur Herstellung einer Deletion eingesetzt (Parks et al., 2004).

Die erzeugten Deletionen wurden wiederum unter Verwendung der Test-Primer mit anschließender Sequenzierung molekular charakterisiert.

3.2.5 Rekombination von Mutationen/Deletionen auf FRT-Chromosomen

Um mit dem Allel *Msp-300^{sz75}*, sowie mit der *Cf2*-Deletion *Df(2L)127* und den von uns generierten *Msp-300*-Deletionen Follikelzellklone, bzw. Keimbahnklone erzeugen zu können, mussten diese jeweils auf ein geeignetes FRT-Chromosom rekombiniert werden. Die FRT-Chromosomen trugen jeweils hinter einem Hitzeschockpromotor das *NeoR* Gen, welches Resistenz gegenüber dem Antibioticum Geneticin (G418) verleiht, so dass FRT tragende Fliegen auf G418 haltigem Futter selektioniert werden konnten. Zur Herstellung von G418-Futterröhrchen wurde normales Futter in kleinen Futterröhrchen mit einer Pipettenspitze durchlöchert und dann 330 µl einer G418 Lösung in einer Konzentration von 25 mg/ml aufgetragen und eintrocknen lassen.

Mutante Stämme wurden dann mit dem *P[neoFRT]* Stamm verkreuzt und zunächst zwei Tage auf normalem Futter bei 25°C gehalten. Dann wurden die Kreuzungen in G418 haltige Röhrchen auf 29°C überführt und täglich in frische G418 haltige Röhrchen übertragen, wobei die alten Röhrchen nach zwei Tagen wieder zurück auf 25°C überführt wurden. Die schlüpfenden (G418 resistenten) Männchen wurden einzeln gegen Balancer-Stämme gekreuzt. Wenn sich die daraus isolierten balancierten Stämme als letal erwiesen, wurden

Komplementations-Kreuzungen gegen den ursprünglichen mutanten Stamm durchgeführt, und schließlich von denjenigen Linien, die keine Komplementation zeigten, Stämme etabliert.

3.2.6 Rettung der *Msp-300*-Deletionen und Versuch der Rettung des Dumping-Phänotyps des *Msp-300^{sz75}*-Allels

Die Duplikation *Dp(2;1)B19* (Reuter and Szidonya, 1983), welche auch den gesamten *Msp-300*-Locus enthält, wurde benutzt, um die Letalität der im Rahmen dieser Arbeit generierten *Msp-300*-Deletionen, bzw. den Dumping-Phänotyp des *Msp-300^{sz75}*-Allels zu retten. Zur Rettung der Letalität der Deletionen wurden Weibchen des Genotyps ***Dp(2;1)B19, y[1] ed[1] dp[o2] cl[1]/ Dp(2;1)B19, y[1] ed[1] dp[o2] cl[1]; Df(2L)sc19-9/In(2L)Cy[L]t[R] In(2R)Cy, Cy[1] amos[Roi-1] cn[2] sp[2]*** (Bloomington Stamm Nummer 3815) gegen die jeweiligen *Msp-300-Deletion/CyO* Männchen gekreuzt. (Dabei ist zu beachten, dass der *Cy*-balancer des Defizienz-Stammes anhand des *amos[Roi-1]*-Allels eindeutig von dem Standard *CyO* balancer der *Msp-300*-Deletions-Stämme unterschieden werden konnte.) Die schlüpfenden ***Dp(2;1)B19, y[1] ed[1] dp[o2] cl[1]/Y; Msp-300-Deletion/CyO*** Männchen wurden dann gegen *Msp-300-Deletion/CyO* Weibchen gekreuzt und überprüft ob geradflügelige Fliegen schlüpfen (Homozygotie der *Msp-300*-Deletion im Hintergrund der Duplikation).

Zur Klärung der Frage, ob der Dumping-Phänotyp des *Msp-300^{sz75}*-Allels durch die o.g. Duplikation gerettet werden kann, war es von Vorteil, dass nach Rekombination des *Msp-300^{sz75}* Allels auf das *FRT^{40A}*-Chromosom und darauf folgender Kreuzung gegen den ursprünglichen *Msp-300^{sz75}* Stamm, lebensfähige *Msp-300^{sz75}/Msp-300^{sz75} FRT^{40A}* Fliegen auftraten. In Weibchen dieses Genotyps ist der Dumping-Phänotyp unverändert zu beobachten und die Ovarien zeigen keine *Msp-300* Antikörper-Färbung. Es wurde daher durch Einkreuzen der Duplikation *Dp(2;1)B19* aus dem Bloomington Stamm 3815 (wie oben für die Rettung der *Msp-300*-Deletionen beschrieben) weibliche Fliegen des folgenden Genotyps generiert: ***Dp(2;1)B19, y[1] ed[1] dp[o2] cl[1]/+***; *Msp-300^{sz75}/Msp-300^{sz75} FRT^{40A}* und deren Ovarien und Eigelege untersucht.

3.2.7 Defizienz-Kartierung der Dumping-Mutation auf dem *Msp-300^{sz75}*-Chromosom

Um die den Dumping-Phänotyp hervorrufende Mutation auf dem *Msp-300^{sz75}*-Chromosom zu kartieren wurden durch Kreuzen gegen die Defizienz-Stämme des *Bloomington-deficiency-kit* für Chromosom 2L (siehe Tabelle der verwendeten *Drosophila melanogaster*-Stämme) transheterozygote Weibchen erzeugt und deren Eigelege analysiert. Es wurden jeweils 5-6 *Msp-300^{sz75}/CyO* Weibchen gegen 2-3 Männchen eines Defizienz-Stammes gekreuzt. Die geradflügeligen weiblichen Nachkommen (*Msp-300^{sz75}/Defizienz*) wurden dann mit *w¹¹¹⁸* Männchen zusammengesetzt und die abgelegten Eier auf einen Dumping-Phänotyp hin untersucht.

3.2.8 Komplementations-Tests des *Msp-300^{sz75}*-Chromosoms gegen bekannte Dumping-Mutanten

Um zu untersuchen, ob es sich bei der den Dumping-Phänotyp hervorrufenden Mutation auf dem *Msp-300^{sz75}*-Chromosom um ein neues Allel einer bereits bekannten Dumping-Mutation handelt, wurden durch Kreuzen gegen die im *Bloomington stock center* verfügbaren, auf dem linken Arm von Chromosom 2 lokalisierten Allele bekannter Dumping-Mutanten (siehe Tabelle der verwendeten *Drosophila melanogaster*-Stämme), transheterozygote Weibchen erzeugt und deren Eigelege analysiert. Dabei wurde vorgegangen, wie unter 3.2.7 für die Defizienz-Kartierung beschrieben.

3.2.9 Analyse des Fressverhaltens *Msp-300*-mutanter Larven

Um zu untersuchen, ob die larvale Letalität der *Msp-300*-Deletionen auf einen Defekt bei der Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist, haben wir mutante Larven (Selektion durch Abwesenheit des *CyO-Kr-GFP* balancers) mit Carmine Red (*Sigma*) gefärbter Hefe gefüttert (Pankratz and Hoch, 1995) und die Aufnahme der Hefe unter dem Stereomikroskop verfolgt.

3.2.10 Analyse des larvalen Muskelsystems in polarisiertem Licht

Aufgrund der doppelbrechenden Eigenschaften der Muskeln, lässt sich das larvale Muskelsystem in einem Polarisationsmikroskop analysieren. Dazu wurden Larven des ersten Larvenstadiums auf einen Objektträger mit einem Tropfen PBS übertragen und vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt. Daraufhin wurde das Präparat durch Absaugen eines Teils der Flüssigkeit abgeflacht. Das Präparat wurde schließlich im Mikroskop zwischen zwei gekreuzte Polarisatoren platziert, so dass die gestreifte Muskulatur im Durchlicht deutlich hervortrat (nach Michael Bate, persönliche Kommunikation).

3.2.11 Anfertigung von Eihüllen-Präparaten und embryonalen Kutikula-Präparaten

Zur Analyse der embryonalen Kutikula wurden Fliegen des gewünschten Genotypes in belüfteten Röhrchen auf beheften Apfelsaftagarplatten zur Ei-Ablage gebracht. Die Eier (Wildtyp älter als 24 h, Mutanten älter als 48 h) wurden dann mit einem Pinsel abgesammelt und in einem Drahtkorb mit Wasser gewaschen, anschließend für 3-5 Minuten mit 50% NaOCl dechorionisiert, danach sofort wieder gewaschen, und schließlich in einer Mischung aus Hoyer's-Medium und Milchsäure, im Verhältnis 1:1, eingebettet.

Eihüllen wurden mit Wasser gewaschen und in demselben Medium eingebettet. Die eingebetteten Präparate wurden vor dem Fotografieren mindestens 24 Stunden lang bei 60°C inkubiert.

3.2.12 Antikörper-Färbung und *in-situ*-Hybridisierung

3.2.12.1 Fixierung von Embryonen für Antikörper-Färbungen

Die mittels 50% NaOCl dechorionisierten Embryonen wurden mit Wasser gewaschen, in ein Heptan-Fix übertragen (5 ml 4% Formaldehyd in PEMS (0,1 M Pipes, 2 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, pH 6,9) + 5 ml Heptan) und darin 20 Minuten leicht geschüttelt. Danach wurde die untere Phase (Formaldehyd) entfernt und das gleiche Volumen an Methanol zugegeben. Durch starkes Schütteln wurden die meisten der Embryonen devitellinisiert und sanken daher auf den Boden des Glas-Reaktionsgefäßes. Das Heptan und der Großteil des Methanols wurden abgenommen und die Embryonen im Methanol in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In dem Methanol konnten die Embryonen dann bei –20°C gelagert werden.

3.2.12.2 Fixierung von Ovarien für Antikörper-Färbungen und *in-situ*-Hybridisierungen

Am Abend vor der Durchführung der Fixierung wurden 20 bis 40 Weibchen des gewünschten Genotypes in frische Futterröhrchen transferiert, um die Weibchen zur Eiablage anzuregen und somit die Bildung neuer Eikammern zu gewährleisten. Am darauffolgenden Tag wurden die Ovarien dann unter dem Stereomikroskop in eiskaltem PBST herauspräpariert und anschließend fixiert. Für Antikörperfärbungen wurden die Ovarien 10 Minuten in 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Für *in-situ*-Hybridisierungen wurden die Ovarien zunächst 20 Minuten fixiert in 200 µl 4% Formaldehyd in PBST, 20 µl DMSO und 600 µl Heptan fixiert, danach wurde die Heptan-Phase vollständig entfernt und die Ovarien weitere 5 Minuten in 500 µl 4% Formaldehyd (in PBST) fixiert. Zum Schluß wurden die Ovarien 4 mal kurz mit PBST gewaschen. Die für *in-situ*-Hybridisierung bestimmten Ovarien wurden, falls nötig, zur Lagerung bei –20 °C in Methanol überführt.

3.2.12.3 Antikörper-Färbung von Embryonen

Die *Drosophila*-Embryonen wurden über mehrere Tage hinweg täglich gesammelt und danach fixiert, um eine möglichst große Anzahl an Embryonen für die *in-situ*-Hybridisierung zur Verfügung zu haben.

Die fixierten Embryonen wurden durch 3 maliges Waschen mit PBST rehydriert. Zum Blocken von unspezifischen Antikörper-Binde-Stellen wurden die Embryonen dreimal je 30 Min. mit 1% BSA in PBST inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Embryonen dann zunächst zweimal kurz mit PBST gewaschen und dann durch viermaliges Waschen je 30 Min. lang mit 1% BSA in PBST wiederum unspezifische Bindungsstellen blockiert. Mit dem sekundären Antikörper wurden die Embryonen ca. 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Embryonen zweimal kurz und dreimal je 30 Min. lang mit PBST gewaschen und anschließend in *Vectashield* (Linaris) Einbettungs-Medium eingebettet.

3.2.12.4 Antikörper-Färbung von Ovarien

Zum Blocken von unspezifischen Antikörper-Binde-Stellen wurden fixierte Ovarien 1 Stunde in 1% BSA in PBST (1% Triton) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde bei 4°C über Nacht in PBST (0,3% Triton) durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Ovarien zunächst zweimal kurz mit PBST gewaschen und dann durch ein- bis zweistündige Inkubation in 10% Ziegen Serum (in PBST, 0,1% Triton) wiederum unspezifische Bindungsstellen blockiert. Mit dem sekundären Antikörper wurden die Ovarien für ca. 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Ovarien dreimal kurz mit PBST gewaschen.

Wenn es sich um einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper gehandelt hat, wurden die Ovarien einfach in *Vectashield (Linaris)* Einbettungs-Medium eingebettet.

3.2.12.5 Optimierte Phalloidin-Färbung von Ovarien zur Visualisierung der Nährzell-Aktin-Bündel

Um die Phalloidin-Färbung der Aktin-Strukturen innerhalb der Nährzellen zu optimieren, wurde das oben stehende Protokoll zur Antikörperfärbung von Ovarien etwas abgewandelt (nach (Guild et al., 1997)). Die isolierten Ovarien wurden 20 Min in 4% Formaldehyd plus 0,1 % Triton X-100 fixiert. Die Färbung der Ovarien erfolgte in PBS plus 4% Formaldehyd, 0,1 % Triton X-100 und FITC-gekoppeltem Phalloidin (Molecular Probes, 1:250). Im Weiteren wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

3.2.12.6 Antikörperfärbung von Imaginalscheiben

Frisch präparierte Imaginalscheiben wurden in 4% Formaldehyd (in PBS) 30 Minuten fixiert und anschließend 3 mal für 10 Minuten in PBT (PBS, 0,3% Triton X-100) gewaschen und dann 30 Minuten in 5% Ziegen Serum geblockt. Mit dem primären Antikörper wurden die Imaginalscheiben 1,5 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, je 20 Minuten in PBT, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (2 Stunden bei RT). Die Imaginalscheiben wurden anschließend dreimal 20 Minuten gewaschen und schließlich in *VectaShield (Linaris)* eingebettet.

3.2.12.7 *In-situ*-Hybridisierung von Ovarien

Die *in-situ*-Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin-markierten Sonden durchgeführt. Die Ovarien wurden wie oben beschrieben präpariert und fixiert und anschließend 5 Minuten in MeOH/PBST (1:1) rehydriert. Nach mehrfachem, kurzem Waschen in PBST wurden die Ovarien erneut 20 Min. in 4% Formaldehyd (FA in PBST) fixiert und anschließend 10 Minuten mit Proteinase K (50µg/ml in PBST) inkubiert. Der Proteinase K-Verdau wurde durch eine Inkubation mit Glycinlösung (2mg/ml Glycin in PBST) für 2 Min. abgestoppt. Anschließend wurden die Ovarien wieder mehrfach kurz mit PBST gewaschen und noch einmal für 20 Min. in 4% FA /PBST refixiert. Nach drei Waschschritten mit PBST wurden die Ovarien 10 Min. in 1:1 Hybridisierungslösung/PBST (Hybridisierungslösung, HL: 50%

Formamid; 5XSSC; 50µl/ml Heparin; 0,2% Tween) und anschließend weitere 10 Min. in 100% HL inkubiert. Danach erfolgte eine einstündige Prähybridisierung bei 55°C in HL+DNA (100µg/ml ss DNA bei 55°C). Die Inkubation mit der RNA-Sonde (50µl HL+DNA + 1µl Sonde) wurde über Nacht, bei 55°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Ovarien folgenden Waschschritten unterzogen: drei mal kurz in 55°C warmer HL, vier mal 30 Min. bei 55°C in warmer HL, 10 Min. in 4:1 HL/PBST bei 55°C, 10 Min. in 3:2 HL/PBST bei 55°C, 10 Min. in 2:3 HL/PBST bei 55°C, 10 Min. in 1:4 HL/PBST bei RT. Hiernach wurden unspezifische Bindestellen geblockt, indem die Ovarien zweimal 20 Min. in PBST/1% BSA bei RT inkubiert wurden. Die nachfolgende Inkubation mit AP-konjugiertem Anti-Digoxigenin Antikörper erfolgte für 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C.

Anschließend wurden die Ovarien zunächst dreimal kurz und dann noch dreimal je 15 Min. in PBST gewaschen. Danach wurde dreimal 5 Min. in RNA-AP-Puffer (100mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9,5, 0,2 % Tween20) gewaschen. Nach Zufabe von 500µl Färbelösung (0,5 ml RNA-AP-Puffer + 2,2 µl NBT [Nitrobluetetrazolium] + 1,7µl X- Phosphat) wurden die Ovarien schließlich in Glasschälchen überführt und solange inkubiert, bis eine Farbreaktion erkennbar wurde (0,5-3 Stunden). Dann wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBST abgestoppt und die Ovarien zurück in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation in 50% Glycerin (in PBST) für mindestens 10 Min. wurden die Ovarien schließlich in 100% Glycerin überführt und unter Verwendung von Glasspacern eingebettet.

3.2.12.8 Fluoreszente *in-situ*-Hybridisierung von Ovarien

Frisch präparierte Ovarien wurden 25 Min. in 4% Formaldehyd (in PBS) fixiert und anschließend dreimal 10 Min. in PBT (PBS, 0,3% Triton X-100) gewaschen. Danach wurden die Ovarien 5 Min. in PBT/Hybridisierungslösung (Hyb.: 50% Formamid; 5XSSC; 50µl/ml Heparin; 0,1% TritonX;100µg/ml ssDNA) und danach noch mal 5 Min. in reiner Hyb inkubiert. Nach der Prähybridisierung in Hyb. über eine Std. bei 65°C erfolgte die Hybridisierung mit der RNA-Sonde (0,5 ng/ml in 100 µl Hyb.) bei 65°C über Nacht. Die Ovarien wurden am nächsten Tag folgenden Waschschritten bei 65°C unterzogen: 20 Min. in Hyb., 20 Min. in PBT/Hyb (1:1) und 5 mal 20 Min. in PBT. Dann erfolgte die Inkubation mit HRP-konjugiertem anti-DIG Antikörper (1:50 in PBT) für eine Stunde bei RT. Danach wurden die Ovarien 3-mal je 10 Min. mit PBT gewaschen. Die Färbung erfolgte anschließend mit Hilfe des *Cy3 Tyramide Signal Amplification (TSA) kit (PerkinElmer)*. Die Cy3-Stamm-Lösung wurde 1:50 verdünnt eingesetzt und die Amplifikationsreaktion für 25 Min. in Dunkelheit durchgeführt. Danach wurden die Ovarien einmal kurz in PBT gewaschen. Nach einer 10 minütigen Inkubation mit DAPI (1:2000 in PBT) wurden die Ovarien nochmals kurz mit PBT gewaschen und schließlich in *VectaShield (Linaris)* eingebettet.

3.2.13 Extraktion genomischer DNA aus adulten Fliegen

Adulte Fliegen wurden 5 Min. bei -80°C gefroren und danach in 50-100µl Puffer A (100mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0,5% SDS) mit einem sterilen Pistill

homogenisiert bis nur noch Kutikula-Bruchstücke sichtbar sind. Danach wurde die Gesamtmenge des Puffers auf 400µl aufgefüllt und der Ansatz 30 Min. bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 800µl 1:2 [5M]K₂CO₃ : [6M]LiCl haben wir das Gemisch für 10 Min. auf Eis präzipitieren lassen und anschließend zentrifugiert (15 Min., 14.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde auf zwei Eppendorf Gefäße aufgeteilt und nach Zugabe von 7/10 Volumen Isopropanol erneut zentrifugiert (15 Min., 14.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1ml kaltem 100% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 rpm, 10 Min., 4°C) wurde der Überstand entfernt und das Pellet nach Trocknung (ca. 10 Min.) in 75 µl TE7RNAse (1µl 10mg/ml RNAse pro 100 µl) gelöst. Nach einer Inkubation für 30 Min. bei 37°C wurde die isolierte DNA einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation unterzogen. Abschließend wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen (meist 50µl) TE aufgenommen.

3.3 Molekularbiologische Arbeiten

Alle molekularbiologischen Techniken wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

3.3.1 Klonierungsarbeiten

3.3.1.1 Klonierung der *pipe*-Reporter-Gen-Konstrukte

Klonierung terminaler Promoter/Enhancer-Deletions-Konstrukte:

Alle *pipe-LacZ*-Konstrukte, bei denen es sich im Vergleich zum ursprünglichen *8kb-pipe-LacZ*-Konstrukt um jeweils terminal verkürzte Enhancer-/Promotorfragmente handelte (proximale und/oder distale Deletionen), wurden folgendermaßen kloniert: Mittels PCR (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) wurden die Teilfragmente mit Hilfe des *pipe-LacZ*-Plasmids (Sen et al., 1998) als template amplifiziert. Dabei war jeweils dem proximalen Primer eine BamHI Schnittstelle und dem distalen Primer eine EcoRI Schnittstelle angefügt. Die PCR wurde für Produkte kleiner als 3 kb mit dem *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) durchgeführt, für größere Produkte mit dem *Expand Long Template PCR System* (Roche). Die PCR Produkte wurden mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham) aufgereinigt und danach über Nacht einem Doppelverdau mit BamHI und EcoRI unterzogen. Schließlich wurden die verdauten PCR Produkte über ein präparatives Gel mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham) isoliert und in den entsprechend doppelt verdauten Vektor C4PLZ, bzw. pHstinger ligiert. Die PCR Reaktionen wurden gemäß den Angaben in den Anleitungen zu den verwendeten PCR kits durchgeführt.

Fusions-PCR für interne Deletionen, bzw. Mutationen:

Im Falle interner Deletionen oder intern veränderter („mutierter“) Sequenz-Bereiche (mutierte potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen), wurde eine Fusions-PCR durchgeführt. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

Für das proximale Fragment wurde ein Vorwärts-Primer (A) mit angehängter BamHI Schnittstelle, für das distale Fragment ein reverser Primer (B) mit angehängter EcoRI Schnittstelle benutzt. Außerdem wurde für das proximale Fragment ein reverser Primer (C) entworfen, der eine Erweiterung von mindestens 10 Basenpaaren enthielt, die im Falle einer gewünschten Deletion komplementär zum 5' Ende des distalen Fragmentes war, bzw. im Falle einer gewünschten „Mutation“, aus der gewünschten mutierten Sequenz bestand. Ebenso enthielt der Vorwärts-Primer (D) des distalen Fragmentes eine Erweiterung, die entweder komplementär zum 3'-Ende des proximalen Fragmentes (gewünschte Deletion) oder komplementär zur gewünschten mutierten Sequenz (gewünschte „Mutation“) war.

Dann wurden zunächst mit Hilfe des *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* zwei separate PCRs für das proximale (Primer A und C) und das distale Fragment (Primer B und D) durchgeführt. Die beiden PCR Produkte wurden mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham)* über ein Agarose Gel aufgereinigt und dann 100ng von jedem Produkt in der folgenden PCR zusammen mit den Primern A und B eingesetzt. Es wurde wiederum das *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* verwendet. Folgende PCR Parameter wurden für den Fusionsschritt benutzt:

Erhitzen auf 94°C 1 Minute, gefolgt von 5 Zyklen mit 30 Sek. bei 94°C, 1 Minute bei einer Temperatur von 55°C und 3,5 Minuten bei 72°C. Direkt im Anschluß daran erfolgte eine Standard-PCR nach den Angaben des *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* für die entsprechende Produktgröße und die verwendeten Primer A und B.

Im Weiteren wurde genauso vorgegangen, wie weiter oben für die Klonierung terminaler Deletionen beschrieben.

3.3.1.2 Klonierung von *pipe-rescue*- und uniform exprimierenden *pipe-ST2*-Konstrukten

Zur Klonierung der *pipe-rescue*-Konstrukte, sowie der Konstrukte die zu einer uniformen Expression der *pipe-ST2*-Isoform führen sollten, wurde zunächst der gewünschte Enhancer/Promotor Abschnitt aus jeweils einem der bereits klonierten *pipe-C4PLZ* Plasmide mittels EcoRI/BamHI Doppelverdau ausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor *pCasper4* ligiert. Im nächsten Schritt wurde das so entstandene *pipe*-Teilpromotor-*pCasper4* Plasmid einem Doppelverdau mit BamHI und XhoI unterzogen. Die *pipe-ST2* cDNA wurde durch einen ebensolchen BamHI/XhoI Doppelverdau aus dem Plasmid *pipe-ST2-pBS-SK+* (Sen et al., 1998) ausgeschnitten und schließlich jeweils in den gewünschten *pipe*-Teilpromotor-*pCasper4* Vektor ligiert. Da sich zeigte, dass die so klonierten *pipe*-Teilpromotor-*pipe-ST2-pCasper4* Plasmide keine gewünschte *pipe-ST2* Expression in transgenen Fliegen bewirkten, wurde in die bereits klonierten Plasmide zwischen Enhancer/Promotor-Fragment und *pipe-ST2*-cDNA noch die Sequenz des *Hsp70* Minimal-Promotors hinein kloniert. Dazu wurde zunächst mittels *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* mit den Primern 5eHspPr_Bam und 3eHspPr_Bam und dem Vektor *pH-Stinger* (Barolo et al., 2000) als template die *Hsp70* Minimalpromotor Sequenz amplifiziert. Wie für die anderen Klonierungen im Detail beschrieben wurde schließlich die BamHI verdaute *Hsp70* Sequenz in den jeweiligen *pipe*-Teilpromotor-*pipe-ST2-pCasper4* Vektor ligiert.

Mittels Test-PCR und abschließender Sequenzierung wurden die Konstrukte mit korrekter Orientierung des *Hsp70* Minimalpromotors selektioniert.

3.3.1.3 Klonierung von GFP-Fusionsproteinen

pUASp-KASH-GFP:

Zunächst wurde die KASH-Domäne mittels PCR an genomischer DNA unter Verwendung der Primer KASH-5e-BglIII und KASH-3e-NotI (die beiden Primer enthielten jeweils eine angehängte BglIII, bzw. eine NotI Schnittstelle) amplifiziert. Nach einer Säulenaufreinigung wurde das PCR-Produkt über Nacht einem BglIII/NotI Doppelverdau unterzogen, danach über Gelelektrophorese aufgereinigt und schließlich in den ebenso verdauten tub-GFP Vektor (tub-KASH-GFP) ligiert.

Das daraus resultierende KASH-GFP Fusionskonstrukt wurde durch einen sequentiellen PstI/NotI Verdau wieder aus dem tub-KASH-GFP ausgeschnitten und in den pUASp-Vektor kloniert.

UASmGFP6-Msp-300-ABD (und tub-Msp-300-ABD-GFP):

Anhand einer cDNA-Bibliothek (hergestellt unter Verwendung von oligo(dT)-Primern mit Hilfe des *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* von *Invitrogen*) wurden mittels *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* unter Verwendung der Primer newABD5e und newABD3e die beiden Aktin-bindenden Calponin-Homologie-Domänen (CH-Domänen), im Folgenden ABD genannt, amplifiziert und zunächst mit Hilfe des *TOPO TA Cloning[®]* Kits (*Invitrogen*) in den Vektor pCR^R2.1-TOPO kloniert. Dieser Vektor diente als template für eine weitere PCR mit dem oben genannten Kit und den Primern ABD5eBam und ABD3eXba (bzw. ABD5eBam und ABD3eNot). Nach einer Säulenaufreinigung wurde das jeweilige PCR-Produkt über Nacht einem BamHI/XbaI (bzw. BamHI/NotI) Doppelverdau unterzogen, danach über Gelelektrophorese aufgereinigt und schließlich in den entsprechend verdauten Vektor pUASpmGFP6, bzw. tubGFP ligiert.

Klonierung des Reportervektors für den Yeast One-Hybrid screen

Siehe unter 3.6.1, Synthese des target-Elements und Klonierung in den pHIS2 Vektor.

3.3.2 Sequenzierung und Verarbeitung der Sequenzdaten

Die zyklischen Sequenzierungsreaktionen (25 Zyklen: 30 sec, 96°C; 15 sec 50°C; 4 Min., 60°C, gefolgt von 5 Min. bei 60°C) wurden unter Verwendung des *Big Dye termination Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)* durchgeführt. Pro Probe wurden 0,5µl Big Dye Terminator Ready Reaction Mix, 1,5 µl Big Dye Sequenzierungspuffer, 200-700 ng Plasmid, bzw. 100 ng PCR Produkt (pro 1 kb; 1/10 der Länge) der zu sequenzierenden DNA und 10pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Nach abgeschlossener Sequenzierungsreaktion wurde das Volumen mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die anschließenden Sequenzierungen wurden durch einen Sequenzierungs-Service mittels eines *ABI Prism 377XL DNA Sequencers (Applied Biosystems)* durchgeführt.

Sequenzdaten von *Drosophila melanogaster* und anderen *Drosophiliden* wurden über das Internet bezogen (<http://www.flybase.org/blast/>; The Flybase Consortium, 2003). Die resultierenden Sequenzdaten wurden mit Hilfe des *Lasergene/DNASTAR-Biocomputing* Software-Paketes der Firma *DNASTAR Inc.* (Madison, Wisconsin) ausgewertet.

3.3.3 Sequenzierung des *Msp-300^{sz75}*-Allels

Zur molekularen Charakterisierung des EMS induzierten Allels *Msp-300^{sz75}* wurde der gesamte *Msp-300*-Locus sequenziert. Dazu wurde zunächst genomische DNA aus homozygot *Msp-300^{sz75}*-mutanten Fliegen (*FRT40A Msp-300^{sz75} / Msp-300^{sz75}*) isoliert. Anhand dieser genomischer DNA wurden mittels Expand Long Template PCR System (Roche) jeweils ungefähr 5 kb große, um ca. 400-500 bp überlappende PCR-Produkte hergestellt, die zusammen den gesamten Locus abdeckten. Die PCR Produkte wurden dann mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham) aufgereinigt und unter Verwendung von jeweils ca. 500 bp auseinander liegenden Sequenzierungsprimern vollständig sequenziert.

3.4 Gelelektrophorese von Proteinen

3.4.1 Untersuchung der DNA-Bindungsaffinität von Proteinen in Gelretardationsexperimenten (nach Benezra et al., 1990)

Zur Überprüfung der DNA-Bindungskapazität von Proteinen wurden 5%ige, native Polyacrylamid-Gele (36,5 ml ddH₂O, 5 ml 10 X TBE, 8,3 ml Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1), 320 µl 10%iges APS und 20 µl TEMED) verwendet. Nach der Polymerisation lief das Gel in 1 X TBE-Puffer mindestens 2 Std. bei 160 Volt vor. Je 40 µl der in DNA-Bindungspuffer gelösten Proteine wurden auf das Gel aufgetragen und für 2-3 Std. bei 160 Volt in 1 X TBE-Puffer aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf 3MM Papier aufgezogen und 1 Std. bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Für die nachfolgende Autoradiographie wurde der *HyperfilmMP* von *Amersham* verwendet. Die Autoradiographie erfolgte bei -70°C für mindestens 12 Stunden.

3.4.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Die *in vitro* Translation der für Gelretardations-Experimente verwendeten Proteine wurde in 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen untersucht. Die Gele bestanden zu etwa drei viertel aus einem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel. Das Trenngel bestand aus einer Lösung von 11,85 ml ddH₂O, 15,65 ml 30%igem Polyacrylamid/Bisacrylamid (30:1), 9,5 ml Trenngelpuffer (s.u.), 560 µl 10%igem APS und 25 µl TEMED. Für das Sammelgel wurden 5ml ddH₂O, 2,22 ml Sammelgelpuffer (s.u.), 1,5 ml 30%iges Polyacrylamid/Bisacrylamid (30:1), 140 µl 10%iges APS und 25 µl TEMED vermischt.

Ein Aliquot von 5 µl der Translationsreaktion wurde mit 20 µl SDS-Probenpuffer (s.u.) vermischt und 2 Min. bei 95°C erhitzt. Hiervon wurde nun jeweils 20 µl auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde der *Mid-Range Marker* der Firma *Promega* verwendet. Das Gel lief für 4-5 Std. bei 160 Volt in 1 X SDS-Polyacrylamid-Laufpuffer (s.u.). Anschließend wurde das Gel 15 Min. in Färbelösung (s.u.) geschüttelt und der Farbstoff anschließend in Entfärbelösung (s.u.) solange ausgewaschen, bis die Proteine deutlich sichtbar waren. Dann wurde das Gel auf 3MM Papier aufgezogen und 2 Std. bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei -70°C für mindestens 12 Std..

4 X Trenngelpuffer (100 ml): 18,17 g Tris, 4 ml 10% SDS, pH 8,8.

4 X Sammelgelpuffer (100 ml): 6,06 g Tris, 4 ml 10% SDS, pH 6,8.

SDS-Probenpuffer (20 ml): 2 ml Glycerol, 4 ml 10% SDS, 4 mg Bromphenolblau, 2,5 ml 4 X Sammelgelpuffer. Unmittelbar vor Benutzung wurden je 20 µl Puffer mit 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben.

10 X SDS-Laufpuffer (1 l): 30 g Tris, 144 g Glycin, 100 ml 10% SDS

Färbelösung: 250 ml Isopropanol, 100 ml Eisessig, 650 ml ddH₂O, 2,5 g Coomassie brilliant blue

Entfärbelösung: 70 ml Eisessig, 830 ml H₂O

3.5 Gelretardationsexperimente (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) (nach Benezra et al., 1990)

In Gelretardationsversuchen werden radioaktiv markierte, doppelsträngige Oligonucleotide mit Proteinen vermischt, deren DNA-Bindungsaffinität untersucht werden soll. Binden Proteine an die DNA, verändert sich die Laufeigenschaft des Oligonucleotids im elektrischen Feld. In einem Polyacrylamidgel kann man gebundene von ungebundenen Oligonucleotiden trennen und somit die spezifischen DNA-Bindungseigenschaften der Proteine dokumentieren.

3.5.1 In vitro Translation mit Kaninchen-Retikulozytenlysat oder Weizenkeim-Extrakt

Retikulozytenlysat aus Kaninchen, bzw. Weizenkeim-Extrakt, enthält alle notwendigen Komponenten, um ein bestimmtes Gen, das in einem Vektor hinter der Kontrolle eines SP6/T3/T7 Promotors vorliegt in einem Ansatz zu transkribieren und nachfolgend zu translatieren. Es wurde in den meisten Fällen mit Kaninchen-Retikulozytenlysat der Firma *Promega* (*TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems*) nach den Vorschriften des Herstellers gearbeitet. In einigen Fällen, in denen das Kaninchen-Retikulozytenlysat keine ausreichende Expression des gewünschten Proteins erbrachte, wurde alternativ mit Weizenkeim-Extrakt (*TNT® Coupled Wheat Germ Extract System, Promega*) gearbeitet.

In beiden Fällen wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zum Testen der Expression verschiedener ESTs wurden 10µl-Reaktionen angesetzt, für EMSA-Experimente 25µl-Reaktionen.

3.5.2 Herstellung von radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonucleotiden

Das einzelsträngige 31bp-*pipe*-Repressorelement-Oligonucleotid wurde mittels T4-Polynucleotidkinase mit einem radioaktiv markierten Phosphorsäurerest versehen. Die Reagenzien wurden dazu wie folgt vermischt:

1µl 31bp-Pipe-Repressor-Bindeelement (10pmol, ~100ng)

4µl 10 X Kinasepuffer

5µl (γ -P³²)-dATP(Amersham)

1µl T4-Polynucleotidkinase (10U) (Biolabs)

Die Reaktion wurde für 1 Std. bei 37°C inkubiert. In einer Sephadex G-50 Säule wurde das Oligonucleotid von den (γ -P³²)-dATP Nucleotiden getrennt. Das Volumen wurde mit TE-Puffer auf 500µl Gesamtvolumen vergrößert, so dass 1 ng markiertes Oligonucleotid in 5µl vorlag. 1/100 des Gesamtvolumens wurden zur Abschätzung des radioaktiven Einbaus entnommen (cpm Bestimmung, basierend auf der Cerenkov Strahlung). Zu 1 ng des markierten wurden 10 ng des unmarkierten komplementären Oligonucleotids gegeben und das Endvolumen mit TE auf 20µl erhöht. Nach zweiminütigem Erhitzen bei 95°C und anschließendem langsamen Abkühlen (1 Std.) auf RT lag das doppelsträngige Nucleotid in einer Konzentration von 0,1 ng/µl vor und wurde bei -20 °C gelagert. Der zehnfache Überschuss an unmarkiertem Oligonucleotid führte dazu, dass alle markierten Oligonucleotide in doppelsträngiger Form vorlagen.

3.5.3 Herstellung von Ovarien-Proteinextrakt („crude tissue extract“)

Der Ovarien „crude tissue extract“ wurde wie bei (Chung et al., 1996) beschrieben isoliert. Dazu wurden adulte Ovarien in 10 Volumen Homogenisierungspuffer (10mM TRIS-HCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 6mM MgCl₂, 2mM DTT, 0,1% Glycerol, 400mM KCl, 100µg/ml PMSF, 100µg/ml TPCK) mittels eines Pistills homogenisiert und anschließend 30 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Für EMSA-Experimente wurden 10-20µg crude extract mit 0,1ng radioaktiv markierter Probe (s. 3.5.2.) und 1µg poly dl-dC als unspezifischem Kompetitor in DNA-Bindungspuffer (s. 3.5.4) 20 Minuten inkubiert.

3.5.4 Dimerisierung und DNA-Bindung der Kandidaten-Transkriptionsfaktoren

Die Kandidaten-Transkriptionsfaktoren wurden wie in 3.5.1 beschrieben in Retikulozytenlysate oder Wizenkeimextrakt transkribiert und translatiert. Da viele Transkriptionsfaktoren als Homodimere an DNA binden wurden die Translationsreaktionen im Anschluß für 20 Min. bei 37°C inkubiert um eine Dimerisierung der Proteinmonomere zu fördern. 18µl der Translationsreaktion wurden mit 1µl Poly(dl-dC) (1µg/µl), 1µl (=0,1 ng) des markierten 31bp-*pipe*-Repressorelement-Oligonucleotids und 20 µl des unten beschriebenen DNA

Bindungspuffers vermischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde das gesamte Volumen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (s. 3.4.1).

2 X DNA-Bindungspuffer: 40 mM Hepes pH 7,6, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 10 % Glycerol

3.6 Herstellung einer Ovarien-spezifischen cDNA-Bibliothek und Durchführung eines Yeast One-Hybrid screens

Zur Durchführung des Yeast One-Hybrid screens wurde das *Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit* verwendet (*Clontech*). Dabei wurde nach den Angaben im User Manual verfahren, daher vermerke ich hier nur Abweichungen davon, bzw. die tatsächlich verwendete Methode, falls Alternativen möglich waren.

Für allgemeine Hefearbeiten wurde nach den Angaben im *Yeast Protocols Handbook* von *Clontech* vorgegangen.

3.6.1 Synthese des target-Elements und Klonierung in den pHIS2 Vektor (VII.B. und C. im User Manual)

Drei Tandem Kopien einer potentiellen Repressorbindestelle von 31 Basenpaaren mit einer MluI-Schnittstelle am 5' Ende und einer EcoRI-Schnittstelle am 3' Ende, wurden als einzelsträngige Oligos synthetisiert (*Sigma Aldrich*), wie im Manual beschrieben hybridisiert und anschließend direkt in den entsprechend verdauten pHIS2-Vektor kloniert.

3.6.2 Ermittlung der Hintergrund HIS3 Expression (VII. D. im User Manual)

Eine Konzentration von 75 mM 3-AT wurde als ausreichend ermittelt, um bei dem klonierten Reporterkonstrukt eine Hintergrund-Expression von HIS3 zu unterdrücken.

Im screen wurden daher SD/-His/-Lei/-Trp + 75 mM 3-AT Platten verwendet (XI.B.2. im User Manual)

3.6.3 Herstellung kompetenter Hefe-Zellen nach der LiAc-Methode (Appendix B im User Manual)

Abweichend von den Angaben im User Manual (unter Punkt 3.) wurden 50-100µl der Vorkultur in 50ml YPDA übertragen.

3.6.4 Generierung einer Ovarien cDNA Bibliothek (IX. im User Manual)

Es wurde zunächst mit Hilfe des *µMACS mRNA Isolation Kit - Small Scale (Milteny Biotec)* mRNA aus frisch präparierten *Drosophila*-Ovarien isoliert. Dazu wurden 40-50 Ovarien in *Graces Insect Medium* präpariert und in einem Eppendorf-Gefäß auf Eis gesammelt. Nach Entfernen des *Graces Mediums* wurden 100µl Lysis Puffer zugegeben und die Ovarien sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach erneuter Zugabe von 1ml Lysis Puffer wurden die Ovarien dann mit einem Pistill zerkleinert und schließlich durch auf- und abpipetieren und anschließendes Vortexen für 3 Min homogenisiert. Zur Reduzierung der Viskosität wurde das Lysat mit Hilfe einer *LysateClear Column* zentrifugiert, wie im Manual zum *µMACS mRNA*

Isolation Kit unter „Protocol for the isolation of mRNA from cells“ beschrieben. Auch die weiteren Schritte der mRNA Isolierung erfolgten genau nach den Angaben dieses Protokolls. Für die Erst-Strang cDNA Synthese wurde der Oligo (dT) Primer (CDS III Primer) eingesetzt.

3.6.5 Identifizierung der positiven cDNA Inserts

Um die cDNA Inserts zu identifizieren, die eine positive Interaktion mit dem Reportervektor zeigten, wurde die Methode des PCR Colony Screenings eingesetzt (XIII. B. im User Manual).

Dabei wurde nach den Angaben im User Manual vorgegangen, allerdings wurden eigene Primer (synthetisiert von *Sigma Aldrich*) verwendet und in den meisten Fällen wurde mit dem *REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma Aldrich)* gearbeitet. Nur in den Fällen, in denen mit Hilfe des *ReadyMix* kein Produkt erzeugt werden konnte, wurde der im User Manual empfohlene *Advantage 2 PCR Polymerase Mix* verwendet.

Das PCR Produkt wurde auf einem Gel getestet, und wenn nur eine klare Bande vorlag, direkt mit Hilfe des *5' AD LD-insert primers* sequenziert. Die Sequenz wurde dann direkt gegen das *Drosophila*-Genom geblastet (unter <http://www.flybase.org/blast/>) und dadurch das Insert identifiziert.

3.6.6 Isolierung der cDNA-Insert-pGADT7-Rec[2]-Plasmide (Bait-Plasmide)

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit(s. XIII. B. im User Manual) Hilfe des *Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation Kit (Clontech)* nach den Angaben des Herstellers.

3.7 Identifizierung cis-regulatorischer Elemente mit Hilfe von Bioinformatik-Software

Um die verschiedenen frei verfügbaren Bioinformatik-Programme nutzen zu können, die aufgrund der Berücksichtigung phylogenetischer Daten (phylogenetic footprinting, siehe Einleitung) besonders viel versprechend zur Identifikation potentieller *cis*-regulatorischer Module eingesetzt werden können, mussten zunächst die Sequenzen der homologen *pipe*-Promotor/Enhancer-Regionen anderer *Drosophiliden* identifiziert und erfasst werden.

Dazu wurde die Sequenz des ersten Exon des *Drosophila melanogaster (D.mel.) pipe*-Locus, welches hoch konserviert und bei *D.mel.* in allen 11 Splice-Varianten vorhanden ist, gegen die seinerzeit verfügbaren Genome der verschiedenen *Drosophiliden (D. yakuba, D. erecta, D. ananassae, D. pseudoobscura, D. mojavensis, D. virilis)* geblastet (<http://www.flybase.org/blast/>). Dadurch wurde zunächst jeweils der Contig identifiziert, der die Sequenz des *pipe*-Locus enthielt. Danach wurde jeweils eine Sequenz von drei Kilobasen upstream des identifizierten ersten Exons mit den 500 bp der *D. mel.* Promotor/Enhancer Sequenz align (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>), die zum damaligen Zeitpunkt als der Bereich identifiziert worden war, der eine potentielle Repressor-Bindestelle enthält und eine deutliche Konservierung aufweist. Dadurch konnte anhand der Homologie der relevante Bereich auf jeweils ungefähr 500 bp eingeschränkt werden. Die so identifizierten *cis*-regulatorischen Bereiche wurden als Input in den unterschiedlichen

Programmen eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben waren die Programme online verfügbar und eine Installation auf dem eigenen Rechner nicht nötig.

Für die in der Arbeit dargestellten Daten wurden insbesondere die folgenden Programme verwendet:

Zum Vergleich und Alignment *cis*-regulatorischer Sequenzen verschiedener Spezies:

UCSC Genome Browser (Kent et al., 2002); <http://genome.ucsc.edu/index.html>

(inclusive des **PhastCons** tools (Siepel et al., 2005))

VISTA Browser (Brudno et al., 2003; Frazer et al., 2004; Kent, 2002); <http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>)

GenomeVISTA ((Bray et al., 2003; Couronne et al., 2003; Kent, 2002);

<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/GenomeVista>)

bayes aligner ((Zhu et al., 1998); http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/bayesian/bayes/bayes_align12.pl)

GeneDoc ((Nicholas et al., 1997); <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>; Installation auf Windows-PC nach download von der angegebene Adresse)

Zur Identifizierung potentieller *cis*-regulatorischer Module (enhancer prediction):

Lwf-scan (inklusive **Lwf-train**) ((Nazina and Papatsenko, 2003); https://webfiles.berkeley.edu/~dap5/data_01/tools.html; Software für win32 Benutzeroberflächen, Kommandozeilen gesteuert, download von der angegebenen Adresse und Installation auf Windows-PC

Darstellung des Ergebnisses mittels:

Gnuplot (freeware, Plotting-Utility zur Darstellung der Lwf-scan Ergebnisse, download: siehe Lwf-scan)

Zur Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen:

MEME/MAST ((Bailey and Elkan, 1994; Bailey and Elkan, 1995b; Bailey and Gribskov, 1998); <http://meme.sdsc.edu/meme/website/intro.html>)

Most ((Pizzi et al., 2005); <http://telethon.bio.unipd.it/MOST/servlet/cluster4>), verwendet das Verbumculus Software Tool (Apostolico et al., 2003; Apostolico et al., 2000)

AlignACE ((Hughes et al., 2000); <http://atlas.med.harvard.edu/>)

DiAlign ((Morgenstern, 1999; Morgenstern, 2004); <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>)

FootPrinter ((Blanchette et al., 2002; Blanchette and Tompa, 2002; Blanchette and Tompa, 2003); <http://bio.cs.washington.edu/software.html>)

MotifSampler (and accompanying tools) ((Thijs et al., 2001; Thijs et al., 2002); <http://www.esat.kuleuven.ac.be/~thijs/Work/MotifSampler.html>)

JASPAR ((Lenhard and Wasserman, 2002; Sandelin et al., 2004); http://jaspar.cgb.ki.se/cgi-bin/jaspar_db.pl)

Credo ((Hindemitt and Mayer, 2005); <http://mips.gsf.de/proj/regulomips/credo.htm>)

SOMBRERO ((Mahony et al., 2005a; Mahony et al., 2005b); <http://bioinf.nuigalway.ie/sombrero/>; download von der angegebenen Adresse und Installation auf Linux-System)

WeederH (Pavesi et al., 2006; Pavesi et al., 2007; <http://159.149.109.16/modtools/>)

Zur Darstellung der Sequenz-Logos:

WebLogo (Crooks et al., 2004; Schneider and Stephens, 1990; <http://weblogo.berkeley.edu/>)

4 Literaturverzeichnis

- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M. A. and Jazwinska, A.** (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *Embo J.* **20**, 3298-305.
- Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M. and Sanes, J. R.** (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* **275**, 31986-95.
- Apostolico, A., Bock, M. E. and Lonardi, S.** (2003). Monotony of surprise and large-scale quest for unusual words. *J Comput Biol* **10**, 283-311.
- Apostolico, A., Bock, M. E., Lonardi, S. and Xu, X.** (2000). Efficient detection of unusual words. *J Comput Biol.* **7**, 71-94.
- Arnosti, D. N.** (2002). Design and function of transcriptional switches in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol.* **32**, 1257-73.
- Arnosti, D. N.** (2003). Analysis and function of transcriptional regulatory elements: insights from *Drosophila*. *Annu Rev Entomol* **48**, 579-602.
- Arnosti, D. N., Gray, S., Barolo, S., Zhou, J. and Levine, M.** (1996). The gap protein knirps mediates both quenching and direct repression in the *Drosophila* embryo. *Embo J.* **15**, 3659-66.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Astigarraga, S., Grossman, R., Diaz-Delfin, J., Caelles, C., Paroush, Z. and Jimenez, G.** (2007). A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *Embo J.* **26**, 668-77. Epub 2007 Jan 25.
- Atkey, M. R., Lachance, J. F., Walczak, M., Rebello, T. and Nilson, L. A.** (2006). Capicua regulates follicle cell fate in the *Drosophila* ovary through repression of mirror. *Development.* **133**, 2115-23. Epub 2006 May 3.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D. and Zhang, X. F.** (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* **56**, 127-55.
- Bailey, T. L. and Elkan, C.** (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28-36.
- Bailey, T. L. and Elkan, C.** (1995a). Unsupervised Learning of Multiple Motifs in Biopolymers Using Expectation Maximization. *Machine Learning* **21**, 51-80.
- Bailey, T. L. and Elkan, C.** (1995b). The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 21-9.
- Bailey, T. L. and Gribskov, M.** (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* **14**, 48-54.
- Baonza, A., Murawsky, C. M., Travers, A. A. and Freeman, M.** (2002). Pointed and Tramtrack69 establish an EGFR-dependent transcriptional switch to regulate mitosis. *Nat Cell Biol.* **4**, 976-80.
- Bar-Sagi, D. and Hall, A.** (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell.* **103**, 227-38.
- Barolo, S., Carver, L. A. and Posakony, J. W.** (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques.* **29**, 726, 728, 730, 732.
- Barolo, S. and Posakony, J. W.** (2002). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev.* **16**, 1167-81.
- Beck, K. A.** (2005). Spectrins and the Golgi. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 374-82.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H.** (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell.* **61**, 49-59.
- Berg, C. A.** (2005). The *Drosophila* shell game: patterning genes and morphological change. *Trends Genet.* **21**, 346-55.
- Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. and Steller, H.** (1998). The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell.* **95**, 331-41.
- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z. and Steller, H.** (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell.* **2**, 159-70.
- Berman, B. P., Pfeiffer, B. D., Laverly, T. R., Salzberg, S. L., Rubin, G. M., Eisen, M. B. and Celniker, S. E.** (2004). Computational identification of developmental enhancers: conservation and function of transcription factor binding-site clusters in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura*. *Genome Biol* **5**, 20.
- Bilu, Y. and Barkai, N.** (2005). The design of transcription-factor binding sites is affected by combinatorial regulation. *Genome Biol* **6**, 2.

- Blackwood, E. M. and Kadonaga, J. T.** (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*. **281**, 60-3.
- Blanchette, M., Kent, W. J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A. F., Roskin, K. M., Baertsch, R., Rosenbloom, K., Clawson, H., Green, E. D. et al.** (2004). Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Res.* **14**, 708-15.
- Blanchette, M., Schwikowski, B. and Tompa, M.** (2002). Algorithms for phylogenetic footprinting. *J Comput Biol* **9**, 211-23.
- Blanchette, M. and Sinha, S.** (2001). Separating real motifs from their artifacts. *Bioinformatics*. **17**, S30-8.
- Blanchette, M. and Tompa, M.** (2002). Discovery of regulatory elements by a computational method for phylogenetic footprinting. *Genome Res.* **12**, 739-48.
- Blanchette, M. and Tompa, M.** (2003). FootPrinter: A program designed for phylogenetic footprinting. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3840-2.
- Bloom, K.** (2001). Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *Curr Biol* **11**, R326-9.
- Boffelli, D., McAuliffe, J., Ovcharenko, D., Lewis, K. D., Ovcharenko, I., Pachter, L. and Rubin, E. M.** (2003). Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science*. **299**, 1391-4.
- Bonaldo, M. F., Lennon, G. and Soares, M. B.** (1996). Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* **6**, 791-806.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-54.
- Brand, A. H. and Dormand, E. L.** (1995). The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 572-8.
- Brandt, A., Papagiannouli, F., Wagner, N., Wilsch-Brauninger, M., Braun, M., Furlong, E. E., Loserth, S., Wenzl, C., Pilot, F., Vogt, N. et al.** (2006). Developmental control of nuclear size and shape by Kugelkern and Kurzkern. *Curr Biol.* **16**, 543-52. Epub 2006 Feb 2.
- Bray, N., Dubchak, I. and Pachter, L.** (2003). AVID: A global alignment program. *Genome Res.* **13**, 97-102.
- Brazma, A., Jonassen, I., Vilo, J. and Ukkonen, E.** (1998). Predicting gene regulatory elements in silico on a genomic scale. *Genome Res.* **8**, 1202-15.
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Saxton, W. M. and Duffy, J. B.** (2002). Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol* **12**, 1541-5.
- Brown, J. L., Sonoda, S., Ueda, H., Scott, M. P. and Wu, C.** (1991). Repression of the *Drosophila* fushi tarazu (ftz) segmentation gene. *Embo J.* **10**, 665-74.
- Brown, K. E., Kerr, M. and Freeman, M.** (2007). The EGFR ligands Spitz and Keren act cooperatively in the *Drosophila* eye. *Dev Biol.* **307**, 105-13. Epub 2007 May 4.
- Brudno, M., Malde, S., Poliakov, A., Do, C. B., Couronne, O., Dubchak, I. and Batzoglou, S.** (2003). Glocal alignment: finding rearrangements during alignment. *Bioinformatics*. **19**, i54-62.
- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klambt, C.** (1994). The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature*. **370**, 386-9.
- Bryan, J., Edwards, R., Matsudaira, P., Otto, J. and Wulfkuhle, J.** (1993). Fascin, an echinoid actin-bundling protein, is a homolog of the *Drosophila* singed gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9115-9.
- Buchenau, P., Saumweber, H. and Arndt-Jovin, D. J.** (1997). The dynamic nuclear redistribution of an hnRNP K-homologous protein during *Drosophila* embryo development and heat shock. Flexibility of transcription sites in vivo. *J Cell Biol* **137**, 291-303.
- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M.** (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol.* **12**, R85-6.
- Buscariet, M. and Stifani, S.** (2007). The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends Cell Biol.* **17**, 353-61. Epub 2007 Jul 20.
- Bussemaker, H. J., Li, H. and Siggia, E. D.** (2000). Building a dictionary for genomes: identification of presumptive regulatory sites by statistical analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 10096-100.
- Cant, K., Knowles, B. A., Mooseker, M. S. and Cooley, L.** (1994). *Drosophila* singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *J Cell Biol* **125**, 369-80.
- Cardon, L. R. and Stormo, G. D.** (1992). Expectation maximization algorithm for identifying protein-binding sites with variable lengths from unaligned DNA fragments. *J Mol Biol.* **223**, 159-70.

- Casso, D., Ramirez-Weber, F. and Kornberg, T. B.** (2000). GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev.* **91**, 451-4.
- Chasan, R. and Anderson, K. V.** (1989). The role of easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell.* **56**, 391-400.
- Chen, G. and Courey, A. J.** (2000). Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene.* **249**, 1-16.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A. J.** (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* **13**, 2218-30.
- Chinnadurai, G.** (2002). CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell.* **9**, 213-24.
- Choi, C. Y., Kim, Y. H., Kwon, H. J. and Kim, Y.** (1999). The homeodomain protein NK-3 recruits Groucho and a histone deacetylase complex to repress transcription. *J Biol Chem.* **274**, 33194-7.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643-53.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.
- Chung, Y. D., Kwon, H. C., Chung, K. W., Kim, S. J., Kim, K. and Lee, C. C.** (1996). Identification of ovarian enhancer-binding factors which bind to ovarian enhancer 1 of the *Drosophila* genes *yp1* and *yp2*. *Mol Gen Genet.* **251**, 347-51.
- Cinnamon, E., Gur-Wahnon, D., Helman, A., St Johnston, D., Jimenez, G. and Paroush, Z.** (2004). Capicua integrates input from two maternal systems in *Drosophila* terminal patterning. *Embo J.* **23**, 4571-82. Epub 2004 Oct 28.
- Cooley, L. and Theurkauf, W. E.** (1994). Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. *Science* **266**, 590-6.
- Cooley, L., Verheyen, E. and Ayers, K.** (1992). chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* **69**, 173-84.
- Cotton, S., Kim, D., Norvell, A. and Welte, M.** (2007). The delta isoform of the transport regulator Klar plays a role in nuclear positioning within the eye disk and the ovary. In *A. Dros. Res. Conf.* **48**, (San Diego: The Genetics Society of America).
- Cottrell, J. R., Borok, E., Horvath, T. L. and Nedivi, E.** (2004). CPG2: a brain- and synapse-specific protein that regulates the endocytosis of glutamate receptors. *Neuron.* **44**, 677-90.
- Courey, A. J. and Jia, S.** (2001). Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* **15**, 2786-96.
- Couronne, O., Poliakov, A., Bray, N., Ishkhanov, T., Ryaboy, D., Rubin, E., Pachter, L. and Dubchak, I.** (2003). Strategies and tools for whole-genome alignments. *Genome Res.* **13**, 73-80.
- Criqui-Filipe, P., Ducret, C., Maira, S. M. and Wasyluk, B.** (1999). Net, a negative Ras-switchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and de-acetylation. *Embo J.* **18**, 3392-403.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D. and Hodzic, D.** (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol.* **172**, 41-53. Epub 2005 Dec 27.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. and Brenner, S. E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188-90.
- Crosby, M. A., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Zhang, P. and Gelbart, W. M.** (2007). FlyBase: genomes by the dozen. *Nucleic Acids Res.* **35**, D486-91. Epub 2006 Nov 11.
- Danielson, P. B., MacIntyre, R. J. and Fogleman, J. C.** (1997). Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 10797-802.
- DeLotto, R. and Spierer, P.** (1986). A gene required for the specification of dorsal-ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease. *Nature.* **323**, 688-92.
- DeLotto, Y. and DeLotto, R.** (1998). Proteolytic processing of the *Drosophila* Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mech Dev.* **72**, 141-8.
- Dermitzakis, E. T. and Clark, A. G.** (2002). Evolution of transcription factor binding sites in Mammalian gene regulatory regions: conservation and turnover. *Mol Biol Evol.* **19**, 1114-21.
- Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K. and Yamamoto, K. R.** (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science.* **249**, 1266-72.

- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S. et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. **448**, 151-6.
- Dobens, L. L., Peterson, J. S., Treisman, J. and Rafferty, L. A.** (2000). *Drosophila* bunched integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary. *Development*. **127**, 745-54.
- Dodson, G. S., Guarnieri, D. J. and Simon, M. A.** (1998). Src64 is required for ovarian ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development*. **125**, 2883-92.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H. and Hucho, F.** (2001). Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 11943-8. Epub 2001 Oct 2.
- Duchek, P. and Rorth, P.** (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science*. **291**, 131-3.
- Duffy, J. B., Harrison, D. A. and Perrimon, N.** (1998). Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development*. **125**, 2263-71.
- Duncan, J. E. and Warrior, R.** (2002). The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* **12**, 1982-91.
- Duret, L. and Bucher, P.** (1997). Searching for regulatory elements in human noncoding sequences. *Curr Opin Struct Biol*. **7**, 399-406.
- Edwards, K. A. and Kiehart, D. P.** (1996). *Drosophila* nonmuscle myosin II has multiple essential roles in imaginal disc and egg chamber morphogenesis. *Development*. **122**, 1499-511.
- Elnitski, L., Jin, V. X., Farnham, P. J. and Jones, S. J.** (2006). Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res*. **16**, 1455-64. Epub 2006 Oct 19.
- Emberly, E., Rajewsky, N. and Siggia, E. D.** (2003). Conservation of regulatory elements between two species of *Drosophila*. *BMC Bioinformatics*. **4**, 57.
- Fairall, L., Harrison, S. D., Travers, A. A. and Rhodes, D.** (1992). Sequence-specific DNA binding by a two zinc-finger peptide from the *Drosophila melanogaster* Tramtrack protein. *J Mol Biol*. **226**, 349-66.
- Fan, J. and Beck, K. A.** (2004). A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J Cell Sci*. **117**, 619-29. Epub 2004 Jan 6.
- Fang, M., Li, J., Blauwkamp, T., Bhambhani, C., Campbell, N. and Cadigan, K. M.** (2006). C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in *Drosophila*. *Embo J*. **25**, 2735-45. Epub 2006 May 18.
- Feng, X. H. and Derynck, R.** (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-93.
- Fischer-Vize, J. A. and Mosley, K. L.** (1994). Marbles mutants: uncoupling cell determination and nuclear migration in the developing *Drosophila* eye. *Development* **120**, 2609-18.
- Fischer, J. A., Acosta, S., Kenny, A., Cater, C., Robinson, C. and Hook, J.** (2004). *Drosophila* klarsicht has distinct subcellular localization domains for nuclear envelope and microtubule localization in the eye. *Genetics* **168**, 1385-93.
- Fisher, A. L. and Caudy, M.** (1998). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev*. **12**, 1931-40.
- Flores, G. V., Duan, H., Yan, H., Nagaraj, R., Fu, W., Zou, Y., Noll, M. and Banerjee, U.** (2000). Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell*. **103**, 75-85.
- FlyBase Consortium.** (2003). The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res*. **31**, 172-5.
- Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M. and Dubchak, I.** (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res*. **32**, W273-9.
- Freeman, M.** (1994). The spitz gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech Dev*. **48**, 25-33.
- Freeman, M.** (1998). Complexity of EGF receptor signalling revealed in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. **8**, 407-11.
- French, R. L., Cosand, K. A. and Berg, C. A.** (2003). The *Drosophila* female sterile mutation twin peaks is a novel allele of tramtrack and reveals a requirement for Ttk69 in epithelial morphogenesis. *Dev Biol*. **253**, 18-35.
- Fridkin, A., Mills, E., Margalit, A., Neufeld, E., Lee, K. K., Feinstein, N., Cohen, M., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y.** (2004). Matefin, a *Caenorhabditis elegans* germ line-specific SUN-domain

- nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 6987-92. Epub 2004 Apr 20.
- Fried, M. and Crothers, D. M.** (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6505-25.
- Frith, M. C., Fu, Y., Yu, L., Chen, J. F., Hansen, U. and Weng, Z.** (2004). Detection of functional DNA motifs via statistical over-representation. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1372-81. Print 2004.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B. Z. and Klambt, C.** (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the Drosophila embryonic ventral ectoderm. *Development.* **122**, 3355-62.
- Galas, D. J. and Schmitz, A.** (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **5**, 3157-70.
- Garner, M. M. and Revzin, A.** (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3047-60.
- Gaston, K. and Jayaraman, P. S.** (2003). Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* **60**, 721-41.
- Gelbart, W. M.** (1989). The decapentaplegic gene: a TGF-beta homologue controlling pattern formation in Drosophila. *Development.* **107**, 65-74.
- Ghigliione, C., Bach, E. A., Paraiso, Y., Carraway, K. L., 3rd, Noselli, S. and Perrimon, N.** (2002). Mechanism of activation of the Drosophila EGF Receptor by the TGFalpha ligand Gurken during oogenesis. *Development.* **129**, 175-86.
- Gilbert, D. G.** (2007). DroSpeGe: rapid access database for new Drosophila species genomes. *Nucleic Acids Res.* **35**, D480-5.
- Goentoro, L. A., Reeves, G. T., Kowal, C. P., Martinelli, L., Schupbach, T. and Shvartsman, S. Y.** (2006). Quantifying the Gurken morphogen gradient in Drosophila oogenesis. *Dev Cell.* **11**, 263-72.
- Goff, D. J., Nilson, L. A. and Morisato, D.** (2001). Establishment of dorsal-ventral polarity of the Drosophila egg requires capicua action in ovarian follicle cells. *Development.* **128**, 4553-62.
- Golembo, M., Yarnitzky, T., Volk, T. and Shilo, B. Z.** (1999). Vein expression is induced by the EGF receptor pathway to provide a positive feedback loop in patterning the Drosophila embryonic ventral ectoderm. *Genes Dev.* **13**, 158-62.
- Gomes, E. R., Jani, S. and Gundersen, G. G.** (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **121**, 451-63.
- Gonzalez-Reyes, A., Elliott, H. and St Johnston, D.** (1995). Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling. *Nature.* **375**, 654-8.
- Gough, L. L. and Beck, K. A.** (2004). The spectrin family member Syne-1 functions in retrograde transport from Golgi to ER. *Biochim Biophys Acta.* **1693**, 29-36.
- Gough, L. L., Fan, J., Chu, S., Winnick, S. and Beck, K. A.** (2003). Golgi localization of Syne-1. *Mol Biol Cell.* **14**, 2410-24. Epub 2003 Mar 7.
- Grad, Y. H., Roth, F. P., Halfon, M. S. and Church, G. M.** (2004). Prediction of similarly acting cis-regulatory modules by subsequence profiling and comparative genomics in Drosophila melanogaster and D.pseudoobscura. *Bioinformatics.* **20**, 2738-50. Epub 2004 May 14.
- Grady, R. M., Starr, D. A., Ackerman, G. L., Sanes, J. R. and Han, M.** (2005). Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4359-64.
- Gray, S. and Levine, M.** (1996a). Short-range transcriptional repressors mediate both quenching and direct repression within complex loci in Drosophila. *Genes Dev.* **10**, 700-10.
- Gray, S. and Levine, M.** (1996b). Transcriptional repression in development. *Curr Opin Cell Biol.* **8**, 358-64.
- Gray, S., Szymanski, P. and Levine, M.** (1994). Short-range repression permits multiple enhancers to function autonomously within a complex promoter. *Genes Dev.* **8**, 1829-38.
- Greer, E. L. and Brunet, A.** (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* **24**, 7410-25.
- Gross, S. P.** (2003). Dynactin: coordinating motors with opposite inclinations. *Curr Biol.* **13**, R320-2.
- Gross, S. P., Welte, M. A., Block, S. M. and Wieschaus, E. F.** (2000). Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance. *J Cell Biol.* **148**, 945-56.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K. and Wilson, K. L.** (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 21-31.
- Guarente, L.** (1993). Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet.* **9**, 362-6.

- GuhaThakurta, D.** (2006). Computational identification of transcriptional regulatory elements in DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3585-98. Print 2006.
- Guichet, A., Peri, F. and Roth, S.** (2001). Stable anterior anchoring of the oocyte nucleus is required to establish dorsoventral polarity of the *Drosophila* egg. *Dev Biol* **237**, 93-106.
- Guild, G. M., Connelly, P. S., Shaw, M. K. and Tilney, L. G.** (1997). Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. *J Cell Biol* **138**, 783-97.
- Guo, Y., Jangi, S. and Welte, M. A.** (2005). Organelle-specific control of intracellular transport: distinctly targeted isoforms of the regulator Klar. *Mol Biol Cell* **16**, 1406-16.
- Gurdon, J. B. and Bourillot, P. Y.** (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature.* **413**, 797-803.
- Gutzeit, H. O.** (1986). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J Cell Sci* **80**, 159-69.
- Hagan, I. and Yanagida, M.** (1995). The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J Cell Biol* **129**, 1033-47.
- Halfon, M. S., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Sackerson, C. M., Jimenez, F., Baylies, M. K. and Michelson, A. M.** (2000). Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell.* **103**, 63-74.
- Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N., Rautiainen, R., Partanen, J., Ukkonen, E. and Taipale, J.** (2006). Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell.* **124**, 47-59.
- Haque, F., Lloyd, D. J., Smallwood, D. T., Dent, C. L., Shanahan, C. M., Fry, A. M., Trembath, R. C. and Shackleton, S.** (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* **26**, 3738-51.
- Hardison, R. C., Oeltjen, J. and Miller, W.** (1997). Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Res.* **7**, 959-66.
- Harr, R., Haggstrom, M. and Gustafsson, P.** (1983). Search algorithm for pattern match analysis of nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2943-57.
- Harrison, S. D. and Travers, A. A.** (1990). The tramtrack gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the *ftz* transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. *Embo J.* **9**, 207-16.
- Hasan, S., Guttinger, S., Muhlhauser, P., Anderegg, F., Burgler, S. and Kutay, U.** (2006). Nuclear envelope localization of human UNC84A does not require nuclear lamins. *FEBS Lett.* **580**, 1263-8. Epub 2006 Jan 23.
- Hashimoto, C., Gertula, S. and Anderson, K. V.** (1991). Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. *Development.* **111**, 1021-8.
- Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jia, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A. J. and Paroush, Z.** (2005). EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nat Genet.* **37**, 101-5. Epub 2004 Dec 12.
- Hasson, P., Muller, B., Basler, K. and Paroush, Z.** (2001). Brinker requires two corepressors for maximal and versatile repression in Dpp signalling. *Embo J.* **20**, 5725-36.
- Hasson, P. and Paroush, Z.** (2006). Crosstalk between the EGFR and other signalling pathways at the level of the global transcriptional corepressor Groucho/TLE. *Br J Cancer.* **94**, 771-5.
- Hedgecock, E. M. and Thomson, J. N.** (1982). A gene required for nuclear and mitochondrial attachment in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell.* **30**, 321-30.
- Hertz, G. Z., Hartzell, G. W., 3rd and Stormo, G. D.** (1990). Identification of consensus patterns in unaligned DNA sequences known to be functionally related. *Comput Appl Biosci.* **6**, 81-92.
- Hertz, G. Z. and Stormo, G. D.** (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics.* **15**, 563-77.
- Hewitt, G. F., Strunk, B. S., Margulies, C., Priputin, T., Wang, X. D., Amey, R., Pabst, B. A., Kosman, D., Reinitz, J. and Arnosti, D. N.** (1999). Transcriptional repression by the *Drosophila* giant protein: cis element positioning provides an alternative means of interpreting an effector gradient. *Development.* **126**, 1201-10.
- Hill, C. S. and Treisman, R.** (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* **80**, 199-211.
- Hindemitt, T. and Mayer, K. F.** (2005). CREDO: a web-based tool for computational detection of conserved sequence motifs in noncoding sequences. *Bioinformatics.* **21**, 4304-6. Epub 2005 Oct 4.

- Hodzic, D. M., Yeater, D. B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P. D.** (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* **279**, 25805-12. Epub 2004 Apr 12.
- Hong, R. L., Hamaguchi, L., Busch, M. A. and Weigel, D.** (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene AGAMOUS identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell*. **15**, 1296-309.
- Horvitz, H. R. and Sulston, J. E.** (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **96**, 435-54.
- Hsu, T., Bagni, C., Sutherland, J. D. and Kafatos, F. C.** (1996). The transcriptional factor CF2 is a mediator of EGF-R-activated dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* **10**, 1411-21.
- Hsu, T., Gogos, J. A., Kirsh, S. A. and Kafatos, F. C.** (1992). Multiple zinc finger forms resulting from developmentally regulated alternative splicing of a transcription factor gene. *Science*. **257**, 1946-50.
- Hsu, T., McRackan, D., Vincent, T. S. and Gert de Couet, H.** (2001). *Drosophila* Pin1 prolyl isomerase Dodo is a MAP kinase signal responder during oogenesis. *Nat Cell Biol.* **3**, 538-43.
- Hudson, A. M. and Cooley, L.** (2002). Understanding the function of actin-binding proteins through genetic analysis of *Drosophila* oogenesis. *Annu Rev Genet* **36**, 455-88.
- Hughes, J. D., Estep, P. W., Tavazoie, S. and Church, G. M.** (2000). Computational identification of cis-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* **296**, 1205-14.
- Hunter, T.** (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **353**, 583-605.
- Hunter, T. and Karin, M.** (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*. **70**, 375-87.
- Huynh, J. R. and St Johnston, D.** (2004). The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol.* **14**, R438-49.
- Jackle, H. and Jahn, R.** (1998). Vesicle transport: klarsicht clears up the matter. *Curr Biol* **8**, R542-4.
- Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. and Monod, J.** (1960). [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator.]. *C R Hebd Seances Acad Sci.* **250**, 1727-9.
- Jain, A. and Welte, M.** (2007). *In Vivo* engineering of *klarsicht*: A tool kit to dissect a complex gene. In *A. Dros. Res. Conf. 48*, (San Diego: The Genetics Society of America).
- James, K. E., Dorman, J. B. and Berg, C. A.** (2002). Mosaic analyses reveal the function of *Drosophila* Ras in embryonic dorsoventral patterning and dorsal follicle cell morphogenesis. *Development.* **129**, 2209-22.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J. A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A. H., Roth, S. and Guichet, A.** (2002). Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr Biol* **12**, 1971-81.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science*. **293**, 1074-80.
- Jiang, G., den Hertog, J., Su, J., Noel, J., Sap, J. and Hunter, T.** (1999). Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha. *Nature*. **401**, 606-10.
- Jiang, J., Rushlow, C. A., Zhou, Q., Small, S. and Levine, M.** (1992). Individual dorsal morphogen binding sites mediate activation and repression in the *Drosophila* embryo. *Embo J.* **11**, 3147-54.
- Jimenez, G., Guichet, A., Ephrussi, A. and Casanova, J.** (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.* **14**, 224-31.
- Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T. and Liu, Y. C.** (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*. **286**, 309-12.
- Jolly, E. R., Chin, C. S., Herskowitz, I. and Li, H.** (2005). Genome-wide identification of the regulatory targets of a transcription factor using biochemical characterization and computational genomic analysis. *BMC Bioinformatics.* **6**, 275.
- Jordan, K. C., Clegg, N. J., Blasi, J. A., Morimoto, A. M., Sen, J., Stein, D., McNeill, H., Deng, W. M., Tworoger, M. and Ruohola-Baker, H.** (2000). The homeobox gene mirror links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through notch activation. *Nat Genet.* **24**, 429-33.
- Kalscheuer, P.** (2004). Vergleichende und funktionelle Studien zur Evolution der dorsoventralen Musterbildung bei Insekten (Dissertation, AG Roth, Institut für Entwicklungsbiologie, Math.-Nat.-Fak., Universität zu Köln).
- Kelso, R. J., Hudson, A. M. and Cooley, L.** (2002). *Drosophila* Kelch regulates actin organization via Src64-dependent tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol.* **156**, 703-13. Epub 2002 Feb 18.
- Kent, W. J.** (2002). BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* **12**, 656-64.

- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M. and Haussler, D.** (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* **12**, 996-1006.
- Ketema, M., Wilhelmsen, K., Kuikman, I., Janssen, H., Hodzic, D. and Sonnenberg, A.** (2007). Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J Cell Sci.* **120**, 3384-94.
- Khokha, M. K. and Loots, G. G.** (2005). Strategies for characterising cis-regulatory elements in *Xenopus*. *Brief Funct Genomic Proteomic.* **4**, 58-68.
- King, D. C., Taylor, J., Elnitski, L., Chiaromonte, F., Miller, W. and Hardison, R. C.** (2005). Evaluation of regulatory potential and conservation scores for detecting cis-regulatory modules in aligned mammalian genome sequences. *Genome Res.* **15**, 1051-60. Epub 2005 Jul 15.
- King, R. C.** (1970). Ovarian development in *Drosophila melanogaster*: Academic Press, New York.
- Klambt, C.** (1993). The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development.* **117**, 163-76.
- Klingler, M., Erdelyi, M., Szabad, J. and Nusslein-Volhard, C.** (1988). Function of torso in determining the terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature.* **335**, 275-7.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O. and Kimata, K.** (1997). Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *J Biol Chem.* **272**, 13980-5.
- Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N. W., Silbert, J. E. and Rosenberg, R. D.** (1999). Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. *J Biol Chem.* **274**, 10474-80.
- Kolch, W.** (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* **351 Pt 2**, 289-305.
- Konrad, K. D., Goralski, T. J., Mahowald, A. P. and Marsh, J. L.** (1998). The gastrulation defective gene of *Drosophila melanogaster* is a member of the serine protease superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 6819-24.
- Konsolaki, M. and Schupbach, T.** (1998). windbeutel, a gene required for dorsoventral patterning in *Drosophila*, encodes a protein that has homologies to vertebrate proteins of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 120-31.
- Korenbaum, E. and Rivero, F.** (2002). Calponin homology domains at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3543-5.
- Kracklauer, M., Chen, X., Wiora, H., Fischer, J. and Fuller, M.** (2007a). The *D. melanogaster* SUN protein Giacomo is required for male fertility and links axonemal microtubules (MTs) to the spermatid tail plasma membrane. In *A. Dros. Res. Conf.* **48**, (San Diego: The Genetics Society of America).
- Kracklauer, M. P., Banks, S. M. L., Xie, X., Wu, Y. and Fischer, J. A.** (2007b). *Drosophila klaroid* Encodes a SUN Domain Protein Required for Klarsicht Localization to the Nuclear Envelope and Nuclear Migration in the Eye. *Fly* **1**, 75-85.
- Kulkarni, M. M. and Arnosti, D. N.** (2003). Information display by transcriptional enhancers. *Development.* **130**, 6569-75.
- Kulkarni, M. M. and Arnosti, D. N.** (2005). cis-regulatory logic of short-range transcriptional repression in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* **25**, 3411-20.
- Kurada, P. and White, K.** (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell.* **95**, 319-29.
- Lai, Z. C., Fetchko, M. and Li, Y.** (1997). Repression of *Drosophila* photoreceptor cell fate through cooperative action of two transcriptional repressors Yan and Tramtrack. *Genetics.* **147**, 1131-7.
- Lai, Z. C. and Li, Y.** (1999). Tramtrack69 is positively and autonomously required for *Drosophila* photoreceptor development. *Genetics.* **152**, 299-305.
- Lai, Z. C. and Rubin, G. M.** (1992). Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the yan gene, an ETS domain protein. *Cell.* **70**, 609-20.
- Laski, F. A., Rio, D. C. and Rubin, G. M.** (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell.* **44**, 7-19.
- Latchman, D. S.** (1996). Inhibitory transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* **28**, 965-74.
- Lawrence, C. E., Altschul, S. F., Boguski, M. S., Liu, J. S., Neuwald, A. F. and Wootton, J. C.** (1993). Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science.* **262**, 208-14.
- Lawrence, C. E. and Reilly, A. A.** (1990). An expectation maximization (EM) algorithm for the identification and characterization of common sites in unaligned biopolymer sequences. *Proteins* **7**, 41-51.

- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F. and Freeman, M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell*. **107**, 161-71.
- Lee, K. K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y. (2002). Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **13**, 892-901.
- Lee, P. S., Wang, Y., Dominguez, M. G., Yeung, Y. G., Murphy, M. A., Bowtell, D. D. and Stanley, E. R. (1999). The Cbl protooncogene stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *Embo J*. **18**, 3616-28.
- Lee, T. I. and Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**, 77-137.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*. **19**, 459-63.
- LeMosy, E. K., Kemler, D. and Hashimoto, C. (1998). Role of Nudel protease activation in triggering dorsoventral polarization of the *Drosophila* embryo. *Development*. **125**, 4045-53.
- Lenhard, B. and Wasserman, W. W. (2002). TFBS: Computational framework for transcription factor binding site analysis. *Bioinformatics*. **18**, 1135-6.
- Levine, M. and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. **424**, 147-51.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A. et al. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell*. **4**, 1029-40.
- Li, S., Li, Y., Carthew, R. W. and Lai, Z. C. (1997). Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell*. **90**, 469-78.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V. C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B. et al. (2005). Lamin A/C-dependent Localization of Nesprin-2, a Giant Scaffold at the Nuclear Envelope. *Mol Biol Cell* **16**, 3411-24.
- Ligoxygakis, P., Roth, S. and Reichhart, J. M. (2003). A serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*. **13**, 2097-102.
- Lin, H. and Spradling, A. C. (1993). Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria. *Dev Biol*. **159**, 140-52.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M. and Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*. **18**, 2986-96.
- Livneh, E., Glazer, L., Segal, D., Schlessinger, J. and Shilo, B. Z. (1985). The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell*. **40**, 599-607.
- Loots, G. G., Locksley, R. M., Blankespoor, C. M., Wang, Z. E., Miller, W., Rubin, E. M. and Frazer, K. A. (2000). Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science*. **288**, 136-40.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. **70**, 431-42.
- Lucchesi, J. C. (1968). Synthetic lethality and semi-lethality among functionally related mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **59**, 37-44.
- Luders, F., Segawa, H., Stein, D., Selva, E. M., Perrimon, N., Turco, S. J. and Hacker, U. (2003). Slalom encodes an adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter essential for development in *Drosophila*. *Embo J*. **22**, 3635-44.
- Ludwig, M. Z., Bergman, C., Patel, N. H. and Kreitman, M. (2000). Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature*. **403**, 564-7.
- Ludwig, M. Z., Patel, N. H. and Kreitman, M. (1998). Functional analysis of eve stripe 2 enhancer evolution in *Drosophila*: rules governing conservation and change. *Development*. **125**, 949-58.
- Lynch, J. A. and Desplan, C. (2006). A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nat Protoc* **1**, 486-94.
- Ma, Q., Guo, C., Barnewitz, K., Sheldrick, G. M., Soling, H. D., Uson, I. and Ferrari, D. M. (2003). Crystal structure and functional analysis of *Drosophila* Wind, a protein-disulfide isomerase-related protein. *J Biol Chem*. **278**, 44600-7. Epub 2003 Aug 26.
- Macdonald, S. J. and Long, A. D. (2005). Identifying signatures of selection at the enhancer of split neurogenic gene complex in *Drosophila*. *Mol Biol Evol*. **22**, 607-19. Epub 2004 Nov 10.

- Magoulas, C., Loverre-Chyurlia, A., Abukashawa, S., Bally-Cuif, L. and Hickey, D. A.** (1993). Functional conservation of a glucose-repressible amylase gene promoter from *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Evol.* **36**, 234-42.
- Mahajan-Miklos, S. and Cooley, L.** (1994a). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **165**, 336-51.
- Mahajan-Miklos, S. and Cooley, L.** (1994b). The villin-like protein encoded by the *Drosophila* quail gene is required for actin bundle assembly during oogenesis. *Cell* **78**, 291-301.
- Mahony, S., Golden, A., Smith, T. J. and Benos, P. V.** (2005a). Improved detection of DNA motifs using a self-organized clustering of familial binding profiles. *Bioinformatics.* **21 Suppl 1**, i283-91.
- Mahony, S., Hendrix, D., Golden, A., Smith, T. J. and Rokhsar, D. S.** (2005b). Transcription factor binding site identification using the self-organizing map. *Bioinformatics.* **21**, 1807-14. Epub 2005 Jan 12.
- Malone, C. J., Fixsen, W. D., Horvitz, H. R. and Han, M.** (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development* **126**, 3171-81.
- Malone, C. J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M. C., Campbell, J. M., Ahringer, J. and White, J. G.** (2003). The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell.* **115**, 825-36.
- Mani-Telang, P. and Arnosti, D. N.** (2007). Developmental expression and phylogenetic conservation of alternatively spliced forms of the C-terminal binding protein corepressor. *Dev Genes Evol.* **217**, 127-35. Epub 2006 Nov 21.
- Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M.** (1999). Transcriptional coregulators in development. *Science.* **284**, 606-9.
- Mantrova, E. Y. and Hsu, T.** (1998). Down-regulation of transcription factor CF2 by *Drosophila* Ras/MAP kinase signaling in oogenesis: cytoplasmic retention and degradation. *Genes Dev.* **12**, 1166-75.
- Margolis, J. and Spradling, A.** (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development.* **121**, 3797-807.
- Marshall, C. J.** (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* **4**, 82-9.
- Massague, J. and Wotton, D.** (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J.* **19**, 1745-54.
- Matova, N., Mahajan-Miklos, S., Mooseker, M. S. and Cooley, L.** (1999). *Drosophila* quail, a villin-related protein, bundles actin filaments in apoptotic nurse cells. *Development* **126**, 5645-57.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gossling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A. E., Kel-Margoulis, O. V. et al.** (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* **31**, 374-8.
- McCall, K. and Steller, H.** (1998). Requirement for DCP-1 caspase during *Drosophila* oogenesis. *Science* **279**, 230-4.
- McDonald, J. A., Pinheiro, E. M., Kadlec, L., Schupbach, T. and Montell, D. J.** (2006). Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. *Dev Biol.* **296**, 94-103. Epub 2006 Apr 21.
- McGee, M. D., Rillo, R., Anderson, A. S. and Starr, D. A.** (2006). UNC-83 IS a KASH protein required for nuclear migration and is recruited to the outer nuclear membrane by a physical interaction with the SUN protein UNC-84. *Mol Biol Cell.* **17**, 1790-801. Epub 2006 Feb 15.
- McKnight, S. L. and Kingsbury, R.** (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science.* **217**, 316-24.
- Mislow, J. M., Kim, M. S., Davis, D. B. and McNally, E. M.** (2002). Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J Cell Sci* **115**, 61-70.
- Misra, S., Hecht, P., Maeda, R. and Anderson, K. V.** (1998). Positive and negative regulation of Easter, a member of the serine protease family that controls dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Development.* **125**, 1261-7.
- Miyake, S., Lupher, M. L., Jr., Druker, B. and Band, H.** (1998). The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 7927-32.
- Moghal, N. and Sternberg, P. W.** (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol.* **11**, 190-6.

- Montana, E. S. and Littleton, J. T.** (2006). Expression profiling of a hypercontraction-induced myopathy in *Drosophila* suggests a compensatory cytoskeletal remodeling response. *J Biol Chem.* **281**, 8100-9. Epub 2006 Jan 16.
- Morgenstern, B.** (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics.* **15**, 211-8.
- Morgenstern, B.** (2004). DIALIGN: multiple DNA and protein sequence alignment at BiBiServ. *Nucleic Acids Res.* **32**, W33-6.
- Morimoto, A. M., Jordan, K. C., Tietze, K., Britton, J. S., O'Neill, E. M. and Ruohola-Baker, H.** (1996). Pointed, an ETS domain transcription factor, negatively regulates the EGF receptor pathway in *Drosophila* oogenesis. *Development.* **122**, 3745-54.
- Morisato, D. and Anderson, K. V.** (1994). The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell.* **76**, 677-88.
- Morris, N. R.** (2000). Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain. *J Cell Biol* **148**, 1097-101.
- Moses, A. M., Pollard, D. A., Nix, D. A., Iyer, V. N., Li, X. Y., Biggin, M. D. and Eisen, M. B.** (2006). Large-scale turnover of functional transcription factor binding sites in *Drosophila*. *PLoS Comput Biol.* **2**, e130. Epub 2006 Aug 21.
- Mosley-Bishop, K. L., Li, Q., Patterson, L. and Fischer, J. A.** (1999). Molecular analysis of the klarsicht gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. *Curr Biol* **9**, 1211-20.
- Moussian, B. and Roth, S.** (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol.* **15**, R887-99.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Myat, M. M. and Andrew, D. J.** (2002). Epithelial tube morphology is determined by the polarized growth and delivery of apical membrane. *Cell.* **111**, 879-91.
- Naar, A. M., Lemon, B. D. and Tjian, R.** (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* **70**, 475-501.
- Nagel, A. C., Krejci, A., Tenin, G., Bravo-Patino, A., Bray, S., Maier, D. and Preiss, A.** (2005). Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol Cell Biol.* **25**, 10433-41.
- Nazina, A. G. and Papatsenko, D. A.** (2003). Statistical extraction of *Drosophila* cis-regulatory modules using exhaustive assessment of local word frequency. *BMC Bioinformatics.* **4**, 65.
- Neuman-Silberberg, F. S. and Schupbach, T.** (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell.* **75**, 165-74.
- Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M.** (1998). Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science.* **280**, 101-4.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J. and Deerfield, D. W. I.** (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News* **4**, 1-4.
- Nilson, L. A. and Schupbach, T.** (1998). Localized requirements for windbeutel and pipe reveal a dorsoventral prepattern within the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary. *Cell.* **93**, 253-62.
- Niwa, O., Shimanuki, M. and Miki, F.** (2000). Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interaction in fission yeast meiosis. *Embo J.* **19**, 3831-40.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M.** (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell.* **78**, 137-47.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E. and Pawson, T.** (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell.* **73**, 179-91.
- Orr-Weaver, T. L.** (1991). *Drosophila* chorion genes: cracking the eggshell's secrets. *Bioessays.* **13**, 97-105.
- Pabo, C. O. and Sauer, R. T.** (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**, 1053-95.
- Padgett, R. W., St Johnston, R. D. and Gelbart, W. M.** (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature.* **325**, 81-4.

- Padmakumar, V. C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A. A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I. and Korenbaum, E.** (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* **295**, 330-9.
- Padmakumar, V. C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A. A., Gotzmann, J., Foisner, R. and Karakesisoglou, I.** (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci.* **118**, 3419-30.
- Pai, L. M., Barcelo, G. and Schupbach, T.** (2000). D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell.* **103**, 51-61.
- Pankratz, M. J. and Hoch, M.** (1995). Control of epithelial morphogenesis by cell signaling and integrin molecules in the *Drosophila* foregut. *Development.* **121**, 1885-98.
- Parker, L., Stathakis, D. G. and Arora, K.** (2004). Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog Mol Subcell Biol* **34**, 73-101.
- Parkhurst, S. M.** (1998). Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends Genet.* **14**, 130-2.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. et al.** (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet.* **36**, 288-92. Epub 2004 Feb 22.
- Patterson, K., Molofsky, A. B., Robinson, C., Acosta, S., Cater, C. and Fischer, J. A.** (2004). The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol Biol Cell* **15**, 600-10. Epub 2003 Nov 14.
- Pavesi, G., Mereghetti, P., Mauri, G. and Pesole, G.** (2004). Weeder Web: discovery of transcription factor binding sites in a set of sequences from co-regulated genes. *Nucleic Acids Res.* **32**, W199-203.
- Pavesi, G., Mereghetti, P., Zambelli, F., Stefani, M., Mauri, G. and Pesole, G.** (2006). MoD Tools: regulatory motif discovery in nucleotide sequences from co-regulated or homologous genes. *Nucleic Acids Res.* **34**, W566-70.
- Pavesi, G., Zambelli, F. and Pesole, G.** (2007). WeederH: an algorithm for finding conserved regulatory motifs and regions in homologous sequences. *BMC Bioinformatics.* **8**, 46.
- Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McGlade, J. and Henkemeyer, M.** (1993). Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **340**, 279-85.
- Peifer, M., Orsulic, S., Sweeton, D. and Wieschaus, E.** (1993). A role for the *Drosophila* segment polarity gene armadillo in cell adhesion and cytoskeletal integrity during oogenesis. *Development* **118**, 1191-207.
- Peri, F.** (2001). The role of EGF and TGF-beta signaling in specifying the polarity of the *Drosophila* egg and embryo (Dissertation, AG Roth, Institut für Entwicklungsbiologie, Math.-Nat.-Fak., Universität zu Köln).
- Peri, F., Bokel, C. and Roth, S.** (1999). Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev.* **81**, 75-88.
- Peri, F. and Roth, S.** (2000). Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the *Drosophila* egg. *Development.* **127**, 841-50.
- Peri, F., Technau, M. and Roth, S.** (2002). Mechanisms of Gurken-dependent pipe regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development.* **129**, 2965-75.
- Pilot, F., Philippe, J. M., Lemmers, C., Chauvin, J. P. and Lecuit, T.** (2006). Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of *Drosophila* cellularisation. *Development.* **133**, 711-23. Epub 2006 Jan 18.
- Pizzi, C., Bortoluzzi, S., Bisognin, A., Coppe, A. and Danieli, G. A.** (2005). Detecting seeded motifs in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **33**, e135.
- Poortinga, G., Watanabe, M. and Parkhurst, S. M.** (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *Embo J.* **17**, 2067-78.
- Poulin, F., Nobrega, M. A., Plajzer-Frick, I., Holt, A., Afzal, V., Rubin, E. M. and Pennacchio, L. A.** (2005). In vivo characterization of a vertebrate ultraconserved enhancer. *Genomics.* **85**, 774-81. Epub 2005 Apr 15.
- Price, J. V., Clifford, R. J. and Schupbach, T.** (1989). The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell.* **56**, 1085-92.

- Price, J. V., Savenye, E. D., Lum, D. and Breitkreutz, A.** (1997). Dominant enhancers of Egfr in *Drosophila melanogaster*: genetic links between the Notch and Egfr signaling pathways. *Genetics* **147**, 1139-53.
- Rafferty, L. A. and Sutherland, D. J.** (1999). TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads. *Dev Biol.* **210**, 251-68.
- Read, D., Levine, M. and Manley, J. L.** (1992). Ectopic expression of the *Drosophila* tramtrack gene results in multiple embryonic defects, including repression of even-skipped and fushi tarazu. *Mech Dev.* **38**, 183-95.
- Read, D. and Manley, J. L.** (1992). Alternatively spliced transcripts of the *Drosophila* tramtrack gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. *Embo J.* **11**, 1035-44.
- Rebay, I.** (2002). Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from *Drosophila*. *Dev Biol.* **251**, 1-17.
- Reich, A. and Shilo, B. Z.** (2002). Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *Embo J.* **21**, 4287-96.
- Reinsch, S. and Gonczy, P.** (1998). Mechanisms of nuclear positioning. *J Cell Sci* **111**, 2283-95.
- Reuter, G. and Szidonya, J.** (1983). Cytogenetic analysis of variegation suppressors and a dominant temperature-sensitive lethal in region 23-26 of chromosome 2L in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **88**, 277-85.
- Rittenhouse, K. R. and Berg, C. A.** (1995). Mutations in the *Drosophila* gene bullwinkle cause the formation of abnormal eggshell structures and bicaudal embryos. *Development.* **121**, 3023-33.
- Rivero, F., Kuspa, A., Brokamp, R., Matzner, M. and Noegel, A. A.** (1998). Interaptin, an actin-binding protein of the alpha-actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, is developmentally and cAMP-regulated and associates with intracellular membrane compartments. *J Cell Biol* **142**, 735-50.
- Robinson, D. N. and Cooley, L.** (1996). Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel. *Trends Cell Biol* **6**, 474-9.
- Robinson, D. N. and Cooley, L.** (1997). Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the *Drosophila* ovary. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 147-70.
- Robinson, D. N., Smith-Leiker, T. A., Sokol, N. S., Hudson, A. M. and Cooley, L.** (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring canal inner rim depends on cheerio. *Genetics* **145**, 1063-72.
- Roch, F., Jimenez, G. and Casanova, J.** (2002). EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins. *Development.* **129**, 993-1002.
- Rohrbaugh, M., Ramos, E., Nguyen, D., Price, M., Wen, Y. and Lai, Z. C.** (2002). Notch activation of yan expression is antagonized by RTK/pointed signaling in the *Drosophila* eye. *Curr Biol.* **12**, 576-81.
- Rorth, P.** (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* **78**, 113-8.
- Rosenberg-Hasson, Y., Renert-Pasca, M. and Volk, T.** (1996). A *Drosophila* dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mech Dev* **60**, 83-94.
- Roth, S.** (2003). The origin of dorsoventral polarity in *Drosophila*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **358**, 1317-29; discussion 1329.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G. and Schupbach, T.** (1995). cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell.* **81**, 967-78.
- Roth, S., Stein, D. and Nusslein-Volhard, C.** (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell.* **59**, 1189-202.
- Roulet, E., Fisch, I., Junier, T., Bucher, P. and Mermod, N.** (1998). Evaluation of computer tools for the prediction of transcription factor binding sites on genomic DNA. *In Silico Biol* **1**, 21-8.
- Rusch, J. and Levine, M.** (1994). Regulation of the dorsal morphogen by the Toll and torso signaling pathways: a receptor tyrosine kinase selectively masks transcriptional repression. *Genes Dev.* **8**, 1247-57.
- Rusch, J. and Levine, M.** (1996). Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Curr Opin Genet Dev.* **6**, 416-23.
- Rutledge, B. J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y. N. and Perrimon, N.** (1992). The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev.* **6**, 1503-17.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**, 487-91.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandelin, A., Alkema, W., Engstrom, P., Wasserman, W. W. and Lenhard, B.** (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* **32**, D91-4.
- Sapir, A., Schweitzer, R. and Shilo, B. Z.** (1998). Sequential activation of the EGF receptor pathway during *Drosophila* oogenesis establishes the dorsoventral axis. *Development.* **125**, 191-200.
- Schejter, E. D., Segal, D., Glazer, L. and Shilo, B. Z.** (1986). Alternative 5' exons and tissue-specific expression of the *Drosophila* EGF receptor homolog transcripts. *Cell.* **46**, 1091-101.
- Schlessinger, J.** (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev.* **4**, 25-30.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **103**, 211-25.
- Schlessinger, J., Ullrich, A., Honegger, A. M. and Moolenaar, W. H.** (1988). Signal transduction by epidermal growth factor receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **53**, 515-9.
- Schneider, T. D. and Stephens, R. M.** (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097-100.
- Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T. and Simcox, A.** (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev.* **10**, 2302-13.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E.** (1991). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics.* **129**, 1119-36.
- Schwartz, S., Kent, W. J., Smit, A., Zhang, Z., Baertsch, R., Hardison, R. C., Haussler, D. and Miller, W.** (2003). Human-mouse alignments with BLASTZ. *Genome Res.* **13**, 103-7.
- Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R. and Shilo, B. Z.** (1995). Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev.* **9**, 1518-29.
- Schweitzer, R. and Shilo, B. Z.** (1997). A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptor. *Trends Genet.* **13**, 191-6.
- Sen, J., Goltz, J. S., Konsolaki, M., Schupbach, T. and Stein, D.** (2000). Windbeutel is required for function and correct subcellular localization of the *Drosophila* patterning protein Pipe. *Development.* **127**, 5541-50.
- Sen, J., Goltz, J. S., Stevens, L. and Stein, D.** (1998). Spatially restricted expression of pipe in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell.* **95**, 471-81.
- Sergeev, P., Streit, A., Heller, A. and Steinmann-Zwicky, M.** (2001). The *Drosophila* dorsoventral determinant PIPE contains ten copies of a variable domain homologous to mammalian heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Dev Dyn.* **220**, 122-32.
- Shea, M. J., King, D. L., Conboy, M. J., Mariani, B. D. and Kafatos, F. C.** (1990). Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. *Genes Dev.* **4**, 1128-40.
- Shilo, B. Z.** (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res.* **284**, 140-9.
- Shilo, B. Z., Schejter, E. D., Segal, D., Ginsberg, D. S. and Glazer, L.** (1986). The *Drosophila* epidermal growth factor receptor homolog: structure, evolution, and possible functions. *Symp Fundam Cancer Res* **39**, 87-97.
- Shin, J. T., Priest, J. R., Ovcharenko, I., Ronco, A., Moore, R. K., Burns, C. G. and MacRae, C. A.** (2005). Human-zebrafish non-coding conserved elements act in vivo to regulate transcription. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5437-45. Print 2005.
- Shravage, B.** (2005). Signaling networks involved in patterning dorsal chorion structures in *Drosophila* (Dissertation, AG Roth, Institut für Entwicklungsbiologie, Math.-Nat.-Fak., Universität zu Köln).
- Shravage, B. V., Altmann, G., Technau, M. and Roth, S.** (2007). The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in *Drosophila*. *Development.* **134**, 2261-71. Epub 2007 May 16.
- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L. W., Richards, S. et al.** (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* **15**, 1034-50. Epub 2005 Jul 15.
- Simon, M. A., Dodson, G. S. and Rubin, G. M.** (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell.* **73**, 169-77.
- Sinha, S., Schroeder, M. D., Unnerstall, U., Gaul, U. and Siggia, E. D.** (2004). Cross-species comparison significantly improves genome-wide prediction of cis-regulatory modules in *Drosophila*. *BMC Bioinformatics.* **5**, 129.

- Smith, T. F. and Waterman, M. S.** (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol.* **147**, 195-7.
- Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L. and Efstratiadis, A.** (1994). Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 9228-32.
- Spencer, F. A., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M.** (1982). Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell.* **28**, 451-61.
- Spradling, A.** (1993). Developmental genetics of oogenesis. In "The Development of *Drosophila melanogaster*": Cold Spring Harbor Lab. Press, NY.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- Starr, D. A.** (2007). Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. *Mol Biosyst.* **3**, 583-9. Epub 2007 Jul 16.
- Starr, D. A. and Fischer, J. A.** (2005). KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays.* **27**, 1136-46.
- Starr, D. A. and Han, M.** (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* **298**, 406-9.
- Starr, D. A. and Han, M.** (2003). ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J Cell Sci* **116**, 211-6.
- Starr, D. A., Hermann, G. J., Malone, C. J., Fixsen, W., Priess, J. R., Horvitz, H. R. and Han, M.** (2001). unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development* **128**, 5039-50.
- Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E. and Nusslein-Volhard, C.** (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell.* **65**, 725-35.
- Stein, D. S. and Stevens, L. M.** (1991). Establishment of dorsal-ventral and terminal pattern in the *Drosophila* embryo. *Curr Opin Genet Dev.* **1**, 247-54.
- Stormo, G. D. and Hartzell, G. W., 3rd.** (1989). Identifying protein-binding sites from unaligned DNA fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 1183-7.
- Stormo, G. D., Schneider, T. D., Gold, L. and Ehrenfeucht, A.** (1982). Use of the 'Perceptron' algorithm to distinguish translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2997-3011.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature.* **403**, 41-5.
- Strecker, T. R., Halsell, S. R., Fisher, W. W. and Lipshitz, H. D.** (1989). Reciprocal effects of hyper- and hypoactivity mutations in the *Drosophila* pattern gene torso. *Science.* **243**, 1062-6.
- Struffi, P. and Arnosti, D. N.** (2005). Functional interaction between the *Drosophila* knirps short range transcriptional repressor and RPD3 histone deacetylase. *J Biol Chem.* **280**, 40757-65. Epub 2005 Sep 26.
- Suelmann, R. and Fischer, R.** (2000). Nuclear migration in fungi--different motors at work. *Research in Microbiology* **151**, 247-54.
- Sulston, J. E. and Horvitz, H. R.** (1981). Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* **82**, 41-55.
- Sundqvist, A., Sollerbrant, K. and Svensson, C.** (1998). The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding protein-histone deacetylase complex. *FEBS Lett.* **429**, 183-8.
- Sutrias-Grau, M. and Arnosti, D. N.** (2004). CtBP contributes quantitatively to Knirps repression activity in an NAD binding-dependent manner. *Mol Cell Biol.* **24**, 5953-66.
- Swan, A., Nguyen, T. and Suter, B.** (1999). *Drosophila* Lissencephaly-1 functions with Bic-D and dynein in oocyte determination and nuclear positioning. *Nat Cell Biol* **1**, 444-9.
- Szidonya, J. and Reuter, G.** (1988). Cytogenetic analysis of the echinoid (ed), dumpy (dp) and clot (cl) region in *Drosophila melanogaster*. *Genet.Res.Camb.* **51**, 197-208.
- Tagle, D. A., Koop, B. F., Goodman, M., Slightom, J. L., Hess, D. L. and Jones, R. T.** (1988). Embryonic epsilon and gamma globin genes of a prosimian primate (*Galago crassicaudatus*). Nucleotide and amino acid sequences, developmental regulation and phylogenetic footprints. *J Mol Biol.* **203**, 439-55.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Kwan, E. and Rubin, G. M.** (1997). PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell.* **90**, 459-67.
- Tautz, D.** (1992). Redundancies, development and the flow of information. *Bioessays.* **14**, 263-6.
- Theurkauf, W. E., Alberts, B. M., Jan, Y. N. and Jongens, T. A.** (1993). A central role for microtubules in the differentiation of *Drosophila* oocytes. *Development.* **118**, 1169-80.

- Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L. and Alberts, B. M.** (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development*. **115**, 923-36.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. et al.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet*. **36**, 283-7. Epub 2004 Feb 22.
- Thiel, G., Lietz, M. and Hohl, M.** (2004). How mammalian transcriptional repressors work. *Eur J Biochem*. **271**, 2855-62.
- Thijs, G., Lescot, M., Marchal, K., Rombauts, S., De Moor, B., Rouze, P. and Moreau, Y.** (2001). A higher-order background model improves the detection of promoter regulatory elements by Gibbs sampling. *Bioinformatics*. **17**, 1113-22.
- Thijs, G., Marchal, K., Lescot, M., Rombauts, S., De Moor, B., Rouze, P. and Moreau, Y.** (2002). A Gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of coexpressed genes. *J Comput Biol* **9**, 447-64.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. **22**, 4673-80.
- Thummel and Pirrotta.** (1992). *Drosophila Information Service* **71**, 150.
- Tijet, N., Helvig, C. and Feyereisen, R.** (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*. **262**, 189-98.
- Tilney, L. G., Tilney, M. S. and Guild, G. M.** (1996). Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles. *J Cell Biol* **133**, 61-74.
- Tolias, P. P. and Kafatos, F. C.** (1990). Functional dissection of an early *Drosophila* chorion gene promoter: expression throughout the follicular epithelium is under spatially composite regulation. *Embo J*. **9**, 1457-64.
- Tolias, P. P., Konsolaki, M., Halfon, M. S., Stroumbakis, N. D. and Kafatos, F. C.** (1993). Elements controlling follicular expression of the s36 chorion gene during *Drosophila* oogenesis. *Mol Cell Biol*. **13**, 5898-906.
- Tompa, M., Li, N., Bailey, T. L., Church, G. M., De Moor, B., Eskin, E., Favorov, A. V., Frith, M. C., Fu, Y., Kent, W. J. et al.** (2005). Assessing computational tools for the discovery of transcription factor binding sites. *Nat Biotechnol*. **23**, 137-44.
- Tootle, T. L. and Rebay, I.** (2005). Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *Bioessays*. **27**, 285-98.
- Treisman, R.** (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. **8**, 205-15.
- Tronche, F., Ringeisen, F., Blumenfeld, M., Yaniv, M. and Pontoglio, M.** (1997). Analysis of the distribution of binding sites for a tissue-specific transcription factor in the vertebrate genome. *J Mol Biol*. **266**, 231-45.
- Tseng, A. S., Tapon, N., Kanda, H., Cigizoglu, S., Edelmann, L., Pellock, B., White, K. and Hariharan, I. K.** (2007). Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signaling pathway. *Curr Biol*. **17**, 728-33. Epub 2007 Mar 29.
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W. and Gelbart, W. M.** (1996). The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development*. **122**, 1555-65.
- Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M.** (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *Embo J*. **21**, 4277-86.
- van Helden, J., Andre, B. and Collado-Vides, J.** (1998). Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J Mol Biol*. **281**, 827-42.
- Vasseur, S., Hoffmeister, A., Garcia, S., Bagnis, C., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L.** (2002). p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep*. **3**, 165-70. Epub 2002 Jan 29.
- Vavouri, T. and Elgar, G.** (2005). Prediction of cis-regulatory elements using binding site matrices--the successes, the failures and the reasons for both. *Curr Opin Genet Dev*. **15**, 395-402.
- Volk, T.** (1992). A new member of the spectrin superfamily may participate in the formation of embryonic muscle attachments in *Drosophila*. *Development* **116**, 721-30.
- Wadsworth, S. C., Vincent, W. S., 3rd and Bilodeau-Wentworth, D.** (1985). A *Drosophila* genomic sequence with homology to human epidermal growth factor receptor. *Nature*. **314**, 178-80.
- Walenta, J. H., Didier, A. J., Liu, X. and Kramer, H.** (2001). The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol*. **152**, 923-34.

- Wang, M. M. and Reed, R. R.** (1993). Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature*. **364**, 121-6.
- Warn, R. M., Gutzeit, H. O., Smith, L. and Warn, A.** (1985). F-actin rings are associated with the ring canals of the *Drosophila* egg chamber. *Exp Cell Res* **157**, 355-63.
- Wassarman, D. A., Therrien, M. and Rubin, G. M.** (1995). The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. **5**, 44-50.
- Watson, A. D., Edmondson, D. G., Bone, J. R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D. J. and Roth, S. Y.** (2000). Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev*. **14**, 2737-44.
- Welte, M. A.** (2004). Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol* **14**, R525-37.
- Welte, M. A., Gross, S. P., Postner, M., Block, S. M. and Wieschaus, E. F.** (1998). Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell* **92**, 547-57.
- Wen, L. M., Xu, P., Benegal, G., Carvalho, M. R. and Buck, G. A.** (2000a). PPB1, a putative spliced leader RNA gene transcription factor in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. **110**, 207-21.
- Wen, Y., Nguyen, D., Li, Y. and Lai, Z. C.** (2000b). The N-terminal BTB/POZ domain and C-terminal sequences are essential for Tramtrack69 to specify cell fate in the developing *Drosophila* eye. *Genetics*. **156**, 195-203.
- Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1993). CNS midline enhancers of the *Drosophila* slit and Toll genes. *Mech Dev*. **40**, 141-54.
- Wheatley, S., Kulkarni, S. and Karess, R.** (1995). *Drosophila* nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. *Development* **121**, 1937-46.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J.** (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*. **57**, 1172-83.
- Wiche, G.** (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci*. **111**, 2477-86.
- Wieschaus, E. and Nüsslein-Volhard, C.** (1986). Looking at embryos. In *Drosophila a Practical Approach*. (ed. D. B. Roberts). Oxford: IRL Press.
- Wilhelmsen, K., Ketema, M., Truong, H. and Sonnenberg, A.** (2006). KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes. *J Cell Sci*. **119**, 5021-9.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K. and Sonnenberg, A.** (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*. **171**, 799-810.
- Wisotzkey, R. G., Mehra, A., Sutherland, D. J., Dobens, L. L., Liu, X., Dohrmann, C., Attisano, L. and Rafferty, L. A.** (1998). Medea is a *Drosophila* Smad4 homolog that is differentially required to potentiate DPP responses. *Development*. **125**, 1433-45.
- Wittkopp, P. J.** (2006). Evolution of cis-regulatory sequence and function in Diptera. *Heredity*. **97**, 139-47. Epub 2006 Jul 19.
- Wolff, C., Pepling, M., Gergen, P. and Klingler, M.** (1999). Structure and evolution of a pair-rule interaction element: runt regulatory sequences in *D. melanogaster* and *D. virilis*. *Mech Dev*. **80**, 87-99.
- Wu, J., Suka, N., Carlson, M. and Grunstein, M.** (2001). TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol Cell*. **7**, 117-26.
- Xie, X. and Fischer, J.** (2007). Exploring a potential function of *Drosophila* Msp-300 in Nuclear Positioning. In *A. Dros. Res. Conf. 48*, (San Diego: The Genetics Society of America).
- Xiong, H.** (2007). Sun-1, a regulator of the nuclear shape in *Dictyostelium discoideum* (Dissertation, AG Nögel, Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln).
- Xiong, W. C. and Montell, C.** (1993). tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye. *Genes Dev*. **7**, 1085-96.
- Xu, C., Kauffmann, R. C., Zhang, J., Kladny, S. and Carthew, R. W.** (2000). Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye. *Cell*. **103**, 87-97.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Xue, F. and Cooley, L.** (1993). kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* **72**, 681-93.
- Yarden, Y. and Ullrich, A.** (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **57**, 443-78.

- Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W. C., Zhang, H., Yoshimura, A. and Baron, R.** (1999). Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. *J Biol Chem.* **274**, 31707-12.
- Yu, J., Starr, D. A., Wu, X., Parkhurst, S. M., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R. and Han, M.** (2006). The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol.* **289**, 336-45. Epub 2005 Dec 7.
- Zaim, H.** (2005). Analyse von Nesprin-2 defizienten Mäusen (Dissertation, AG Nögel, Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln).
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Lu, J. R. and Olson, E. N.** (2001a). Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor. *J Biol Chem.* **276**, 35-9.
- Zhang, Q., Ragnauth, C., Greener, M. J., Shanahan, C. M. and Roberts, R. G.** (2002). The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics* **80**, 473-81.
- Zhang, Q., Ragnauth, C. D., Skepper, J. N., Worth, N. F., Warren, D. T., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M.** (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci* **118**, 673-87. Epub 2005 Jan 25.
- Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M.** (2001b). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* **114**, 4485-98.
- Zhang, X., Xu, R., Zhu, B., Yang, X., Ding, X., Duan, S., Xu, T., Zhuang, Y. and Han, M.** (2007). Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development.* **134**, 901-8. Epub 2007 Jan 31.
- Zhao, D., Woolner, S. and Bownes, M.** (2000). The Mirror transcription factor links signalling pathways in *Drosophila* oogenesis. *Dev Genes Evol.* **210**, 449-57.
- Zhen, Y. Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A. and Korenbaum, E.** (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **115**, 3207-22.
- Zhu, J., Liu, J. S. and Lawrence, C. E.** (1998). Bayesian adaptive sequence alignment algorithms. *Bioinformatics* **14**, 25-39.
- Zhu, X., Sen, J., Stevens, L., Goltz, J. S. and Stein, D.** (2005). *Drosophila* pipe protein activity in the ovary and the embryonic salivary gland does not require heparan sulfate glycosaminoglycans. *Development.* **132**, 3813-22. Epub 2005 Jul 27.
- Zhu, X., Stevens, L. M. and Stein, D.** (2007). Synthesis of the sulfate donor PAPS in either the *Drosophila* germline or somatic follicle cells can support embryonic dorsal-ventral axis formation. *Development.* **134**, 1465-9. Epub 2007 Mar 7.

5 Anhang

5.1 Ergebnisse der Alignment-Programme bayes aligner und ClustalW

Im Folgenden zeige ich die Resultate der Alignment-Programme, die im Ergebnisteil, aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der mit unterschiedlichen Programmen erzielten Ergebnisse, nicht konkret aufgeführt wurden.

bayes aligner

Der bayes aligner („bayes aligner web application for phylogenetic footprinting“, http://bayesweb.wadsworth.org/cgi-bin/bayes_align12.pl) dient speziell der Analyse paarweiser Alignments *cis*-regulatorischer Regionen. In diesem Fall werden die Alignments durch den so genannten „Bayes block aligner“ Algorithmus (Zhu et al., 1998) erstellt, der eine bayessche („Bayesian“) Variante des klassischen Smith-Waterman Algorithmus (Smith and Waterman, 1981) verwendet. Die Verwendung des bayes aligners ist über eine frei zugängliche Internetseite möglich, wobei hier aber, im Gegensatz zum UCSC Genome Browser und zu GenomeVISTA, die einen direkten Zugang auf bereits alignierte Genome ermöglichen, zwei zu alignende Sequenzen im FASTA Format als Input benötigt werden. Wir haben für die einzelnen paarweisen Alignments jeweils 1,5 kb der *pipe*-upstream-Region von *D. mel.* mit 3 kb der isolierten upstream-Region der verwandten *Drosophila*-Spezies gewählt. Die Entscheidung für das Alignment zunächst einen im Vergleich mit dem *D. mel.* Referenzgenom deutlich größeren Sequenzbereich einzusetzen, war durch das eventuelle Vorliegen größerer Lücken (Gaps) innerhalb der Alignments begründet. Obwohl die bereits besprochenen Ergebnisse des UCSC und des VISTA Browsers das Vorhandensein hoch konservierter Sequenzabschnitte zeigen, ist in beiden Fällen nicht zu erkennen, ob auch die Position dieser potentiellen *cis*-regulatorischen Module zum Transkriptionsstart, bzw. die Position einzelner Module untereinander, konserviert ist, da die Alignment-Gaps nicht visualisiert werden (sofern nicht bis auf die Sequenz herangezoomt wird).

Der bayes aligner konnte in allen gegen *D. mel.* getesteten *Drosophiliden* konservierte Blöcke identifizieren. Im Folgenden zeige ich nur das Ergebnis für den Vergleich mit *D. virilis*, da der Vergleich mit dieser evolutionär am weitesten entfernten Spezies (~ 40 Mio. Jahre) eine besonders hohe Konservierung anzeigt. Der Output des bayesian aligners zeigt jeweils die Wahrscheinlichkeit der Konservierung für jede einzelne Base, einmal in Form eines Graphen (Abb. 5.1. A) und einmal in Form eines Temperatur-Plots, in dem der Grad der Konservierung direkt in der Sequenz durch einen Farbcode angezeigt wird (Abb. 5.1. B). Anhand des Temperaturplots ist die Position der konservierten Basen direkt abzulesen und man erkennt zunächst zwei hoch konservierte Bereiche nahe des Transkriptionsstartes (Basen 15-53 und 91-106), die wahrscheinlich zum eigentlichen Kern-Promotor gehören. Außerdem gibt es einen kurzen, konservierten Bereich bei 729-740. Insbesondere fällt aber der Bereich zwischen Position 979 und 1129 auf, der mehrere, nahe beieinander liegende hoch konservierte Blöcke enthält (979-995, 1005-1012, 1053-1068 und 1096-1129). Dieser Bereich entspricht wiederum ungefähr der schon mit Hilfe der beiden anderen Programme identifizierten hoch konservierten Region.

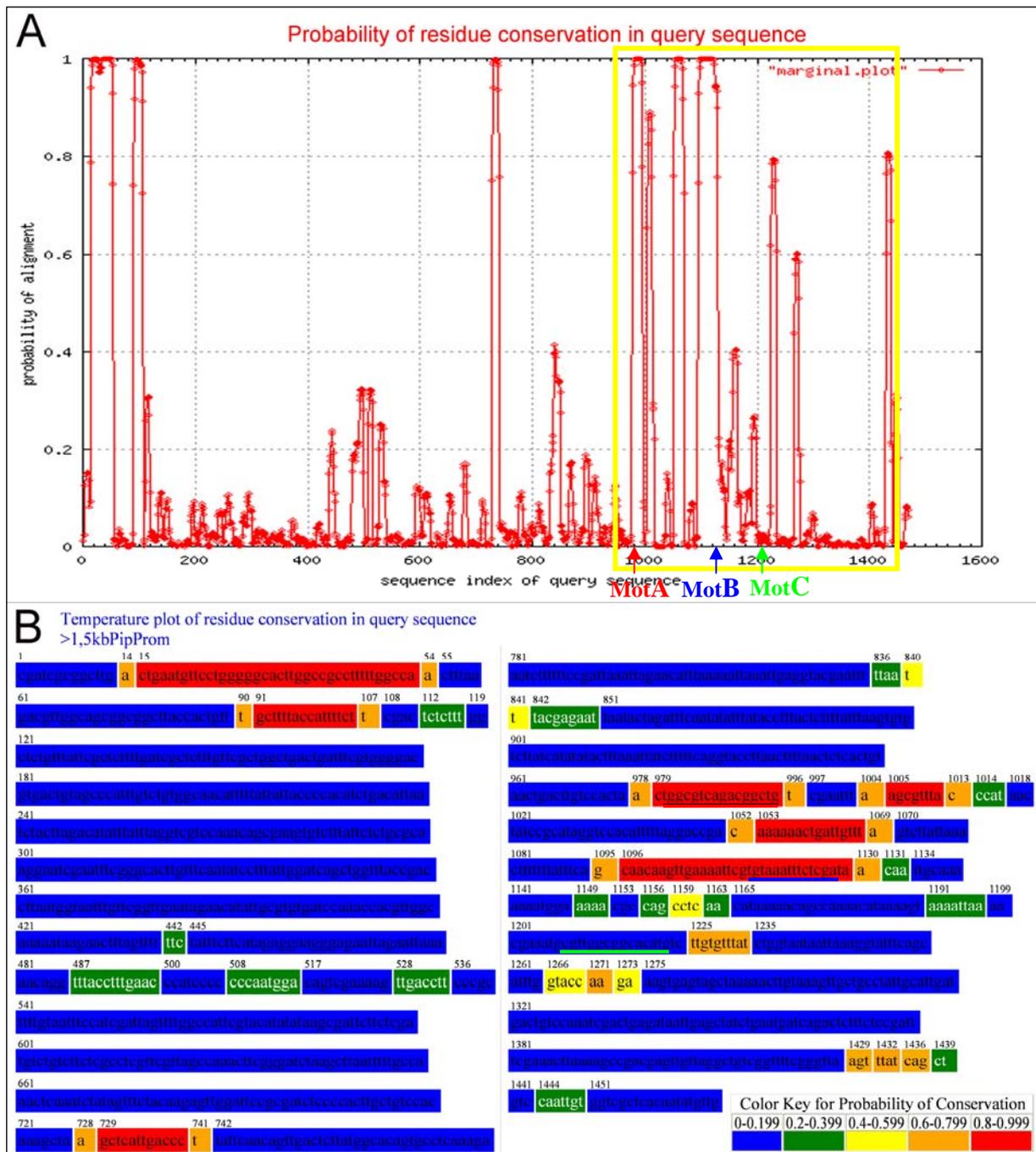


Abbildung 5.1.: Darstellung der Ergebnisse des bayes aligners für das Alignment von 1,5 kb der *pipe*-upstream-Sequenz von *D. mel.* mit 3 kb der *pipe*-upstream-Sequenz von *D. vir.* (A) Graph der Wahrscheinlichkeit der Konservierung jeder Base in der Referenzsequenz (*D. mel.*). Der gelbe Rahmen markiert den ~500 bp Bereich, der für die Analyse mittels TFBS-Vorhersage-Programmen verwendet wurde. Die Lage der identifizierten Motive A-C (s. Abb. 2.14.-2.17.) ist durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Temperatur-Plot zur Darstellung der Konservierung an jeder Position in der Sequenz. Rot steht für höchste Konservierung, blau für geringste. Die Lage der identifizierten Motive A-C ist durch farbige Unterstreichung gekennzeichnet.

5.2 Ausführliche Darstellung der TFBS-Vorhersage-Programme

Im Folgenden stelle ich das im Ergebnisteil nicht behandelte Programm MEME/MAST vor. Außerdem gebe ich für die im Ergebnisteil aufgeführten, von uns verwendeten Programme (mit Ausnahme der bereits ausführlich behandelten Software CREDO), konkrete Angaben zu den verwendeten Parametern, sowie Beispiele für die jeweils ausgegebene graphische Darstellung der Resultate. Darüber hinaus gehe ich ganz kurz auf Vor- und Nachteile der einzelnen Programme ein.

MEME/MAST System

Das MEME Motif discovery tool (Multiple EM for Motif Elicitation (Bailey and Elkan, 1994)) lässt sich auch über das Programm CREDO (s.u.) verwenden, es ist jedoch auch für die direkte Verwendung aufgrund der sehr benutzerfreundlichen Bedienung und insbesondere aufgrund der sehr ausführlichen und ansprechenden Darstellung der Resultate besonders geeignet. Außerdem wichen im Fall von MEME die Ergebnisse bei der direkten Benutzung von den mittels CREDO erhaltenen Resultaten ab, daher stelle ich MEME an dieser Stelle ausführlicher dar. MEME dient der Auffindung von Motiven in einer Gruppe ähnlicher DNA Sequenzen (in unserem Fall homologe *cis*-regulatorische Regionen). Als Motive werden dabei hoch konservierte Regionen erfasst. Das Programm ist also nicht spezifisch auf die Identifizierung *cis*-regulatorischer Motive ausgelegt und erlaubt in der Tat zum Beispiel auch Proteinsequenzen als Input. Die Motive werden in der Reihenfolge nummeriert, wie sie von MEME gefunden werden, wobei normalerweise die statistisch signifikantesten Motive zuerst gefunden werden. Die statistische Signifikanz eines Motivs basiert auf dem log Wahrscheinlichkeits-Quotienten (log likelihood ratio), der Länge und der Anzahl der Vorfälle, sowie auf der Hintergrund-Basen-Häufigkeit und der Größe des Trainings-Satzes. Die mittels MEME identifizierten Motive können direkt als Input für das MAST Motif Alignment and Search Tool (Bailey and Gribskov, 1998) verwendet werden.

Die meisten von uns gewählten Programm-Parameter entsprachen der Standard-Einstellung, abweichend davon haben wir eine beliebige Anzahl von Wiederholungen für das Auftreten eines einzelnen Motivs innerhalb der Sequenzen zugelassen. Außerdem wurde die Größe der Motive auf einen Bereich zwischen 6 und 20 Zeichen (=Basen) und der Gesamt-Output auf die 10 besten Motive eingeschränkt.

Die Abbildung 5.3. zeigen die verschiedenen Daten und graphischen Darstellungen für eines der von MEME ermittelten Motive. Eine Übersichtszeile (Abb. 5.3.A) gibt an, aus wie vielen Basen das Motiv besteht (width), wie oft es auftritt (sites), sowie den log Wahrscheinlichkeits-Quotienten (log likelihood ratio, llr) und die statistische Signifikanz (E-value). Das Alignment darunter zeigt die Sequenzen für jedes Auftreten des Motivs inklusive der benachbarten Basen auf jeder Seite, sortiert nach dem P-Wert und unter Angabe der genauen Lage. Abbildung 5.3.B zeigt unterschiedliche Darstellungen zur Konservierung der einzelnen Basen-Positionen. Die ermittelte Konsensus-Sequenz (das Motiv) wird in Form einer vereinfachten positions-spezifischen Wahrscheinlichkeitsmatrix (simplified position-specific probability matrix, PSPM) angegeben. Das „information content“-Diagramm darunter stellt den Grad der Konservierung für jede Basen-Position graphisch dar. Die mehrstufige Konsensus-Sequenz zeigt die am stärksten konservierten Basen an jeder Position (multilevel consensus sequence). Abbildung 5.3.C zeigt in Form von mittels MAST erstellten Block Diagrammen eine schematische Darstellung der Lage jedes Vorkommens des Motivs in den einzelnen Sequenzen. Die Orientierung des Motivs ist jeweils durch + oder – angegeben.

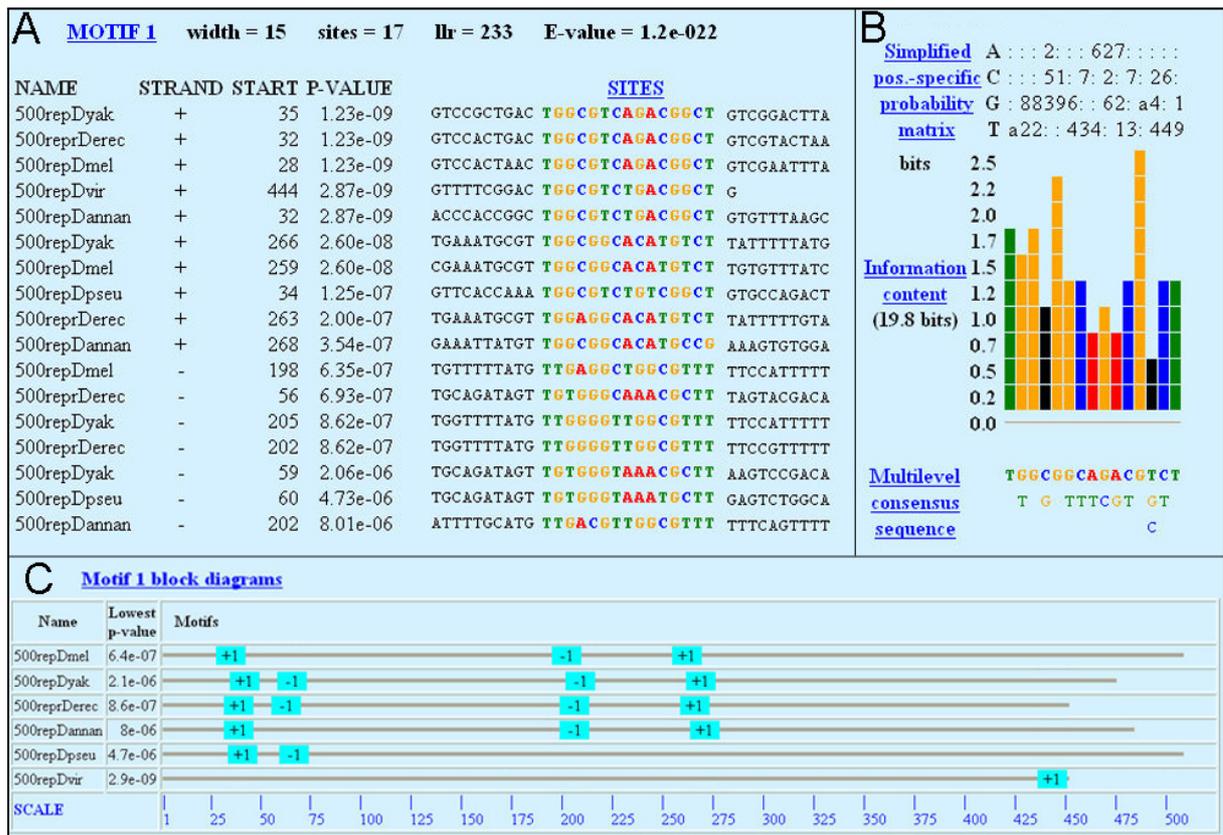


Abbildung 5.3.: Darstellung des MEME-Motivs 1. Erläuterungen im Text

MEME ermöglicht darüber hinaus eine Gesamtdarstellung aller gefundenen Motive in Form eines kombinierten Block-Diagramms (Abb. 5.4.). Jedes Motiv lässt sich aufgrund der Farbe und der Nummerierung identifizieren. Diese sehr übersichtliche Darstellung erleichtert insbesondere den direkten Vergleich des Aufbaus der *cis*-regulatorischen Module zwischen den einzelnen Spezies.

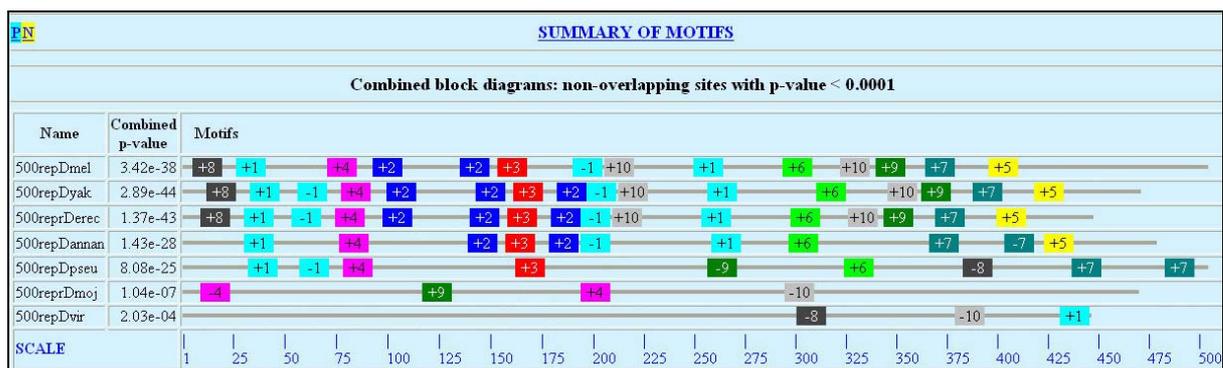


Abbildung 5.4.: MEME-Zusammenfassung. Kombiniertes Block-Diagramm aller von MEME gefundenen Motive.

MOST

Wir haben, wenn nicht die Standardeinstellungen benutzt wurden, folgende Parameter verwendet: Es wurde unter Verwendung der Score Funktion „counted sequences / expected sequences“ nach Kernmotiven mit einer Länge von 7 bp gesucht, wobei beide DNA-Stränge berücksichtigt wurden. Alle daraufhin identifizierten **388 Wörter („surprising words“)** wurden für das Clustering eingesetzt, wobei die Zuordnung einzelner Wörter zu mehreren Clustern erlaubt und der „Similarity threshold“ auf 80% gesetzt wurde. Um die Zahl der

Ergebnisse in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurden von den so ermittelten **227 Clustern** für die nachfolgende Erweiterung der Motive nur solche Cluster eingesetzt die in mindestens vier Sequenzen gefunden wurden und dabei den folgenden Kriterien entsprachen: CQ-Wert (consensus quality) > 1,7 bei auftreten in allen sieben Sequenzen, CQ-Wert > 1,78 bei Auftreten in 6 Sequenzen, CQ > 1,88 bei Auftreten in 5 Sequenzen und CQ-Wert >1,8 bei Auftreten in 4 Sequenzen. Die verbleibenden **53 Cluster** wurden dann unter Verwendung der multi-value Score Funktion und eines Schwellenwertes von 95% um je drei bp zu beiden Seiten erweitert. Schließlich wurden die Cluster ausgewählt, die nach der Erweiterung mit einem beliebigen CQ-Wert in mindestens 6 Sequenzen vorkamen, bzw. mit einem CQ-Wert > 1,4 in 5 Sequenzen und mit einem CQ-Wert > 1,9 in 4 Sequenzen. Am Ende verblieben **23 Cluster**, die diesen Kriterien entsprachen und in die Gesamtauswertung (1.2.2.4) mit einbezogen wurden.

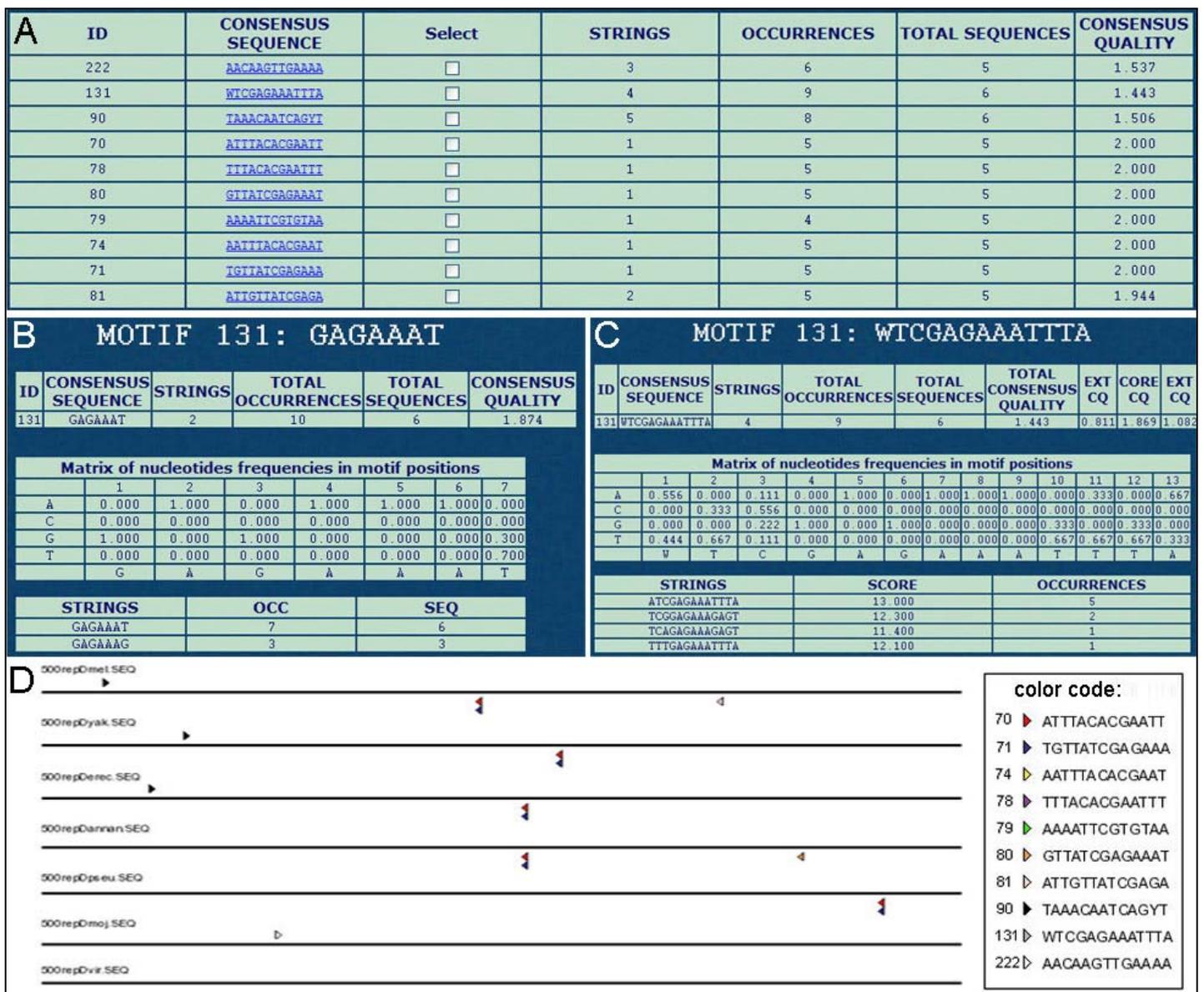


Abbildung 5.5.: Darstellung der MOST Resultate.

Die Abbildung 5.5. A zeigt einen Ausschnitt aus der Tabelle der am Ende verbleibenden, von MOST identifizierten Motive. Die Tabelle gibt an, wie viele verschiedene Versionen des Motivs auftreten (strings), wie oft (occurrences) und in wie vielen Sequenzen (total sequences) das Motiv insgesamt zu finden ist. Außerdem zeigt die Abbildung als Beispiel ein

Motiv (131) vor und nach der Erweiterung in der von MOST angebotenen Darstellung (Abb. 5.5. B, C). Die unterschiedliche Gewichtung für die Konservierung der Kernregion im Vergleich zu den Randbereichen, ist anhand der Matrix deutlich zu erkennen. Jeweils 10 Motive lassen sich, sowohl vor als auch nach der Erweiterung, gleichzeitig graphisch darstellen (Abb. 5.5. D). Allerdings stellte sich heraus, dass die graphische Darstellung fehlerhaft ist, da nur ein Teilbereich jeder Sequenz dargestellt wird, was in der Abbildung daran ersichtlich ist, dass nicht alle der gewählten Motive angezeigt werden. Dieses Problem konnte von uns weder durch eine Veränderung der Browser-Optionen noch durch die Verwendung alternativer Browser umgangen werden.

Das MOST Programm ist insgesamt in der Bedienung relativ zeitaufwändig und kompliziert. Um den Output in einem vernünftigen Rahmen zu halten, ist die manuelle Eliminierung einer großen Zahl von Motiven, die nicht bestimmten Parametern entsprechen, unumgänglich. Die nicht sehr benutzerfreundliche und teilweise sogar unvollständige (im Falle der graphischen Übersicht) Darstellung der Ergebnisse, erschwert dabei die Selektion. Im Endeffekt wurde die von anderen Programmen automatisch vorgenommene Vor-Selektion der Ergebnisse von uns daher als Vorteil gegenüber MOST angesehen. Wir haben dieses Programm trotzdem verwendet und hier vorgestellt, weil die unterschiedliche Behandlung des Kernmotivs im Vergleich zu den Randbereichen, einen sinnvollen Ansatz darstellt, und weil die primäre Erfassung der Motive, im Gegensatz zu vielen anderen Programmen, nicht auf der Konservierung beruht.

SOMBRERO

SOMBRERO wurde als Kommandozeilen gesteuertes Programm auf einem Linux Rechner verwendet. Der erste Schritt ist die Generierung eines Hintergrund-Modells, welches auf der Grundlage der intergenischen Regionen für das der Analyse zugrunde liegende Genom erzeugt wird. Für *Drosophila* steht auf der SOMBRERO homepage ein Hintergrund Modell zum download bereit, welches von uns verwendet wurde.

Im Folgenden gehe ich wieder kurz auf die von uns gewählten Einstellungen ein, soweit diese nicht den Standartwerten entsprachen. Wir haben für jede Motivlänge zwischen 8 und 20 (Basen) eine separate SOM erzeugt. SOMBRERO wertet die verschiedenen SOMs aus und präsentiert die wahrscheinlichsten Transkriptionsfaktor-Bindestellen für alle Motivlängen in einer Liste („Best Patterns“, oben rechts in Abb. 5.6.A). Die Größe der SOM wurde von uns auf 10 (Spalten) x 20 (Zeilen) eingestellt. Außerdem haben wir SOMBRERO mit Hilfe der „-prior“ Option initialisiert, wodurch ein Hintergrund-Binde-Profil der SOM auf der Grundlage bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen eingelesen wird. Das auf der SOMBRERO homepage zum download angebotene Binde-Profil für *Drosophila* wurde auf der Grundlage des Pollard datasets (http://rana.lbl.gov/~dan/bergman2004_matrices.html) erstellt.

Abbildung 5.6.A zeigt die SOMBRERO Resultate in der Darstellung des „SOMBRERO results viewer“. Die farbigen Blöcke stellen die Knoten der SOM dar, die jeweils ein Motiv repräsentieren, wobei der Farbcode anzeigt, wie stark das jeweilige Motiv „überrepräsentiert“ ist. In der Abbildung ist die SOM für eine Motivlänge von 14 bp angewählt, über das „L-mer Length“ drop-down Menü lässt sich die jeweilige SOM für jede beliebige Motivlänge (zwischen 8 und 20, s.o.) anzeigen. Wir haben ausschließlich die in der "Best Patterns" Liste aufgeführten Konsensussequenzen in die Endauswertung mit einbezogen.

Für das in dieser Liste angewählte Motiv (Motiv 22 in Abb. 5.6.A) sind in der Tabelle rechts unten die einzelnen Versionen für jedes Auftreten innerhalb der verschiedenen Sequenzen aufgelistet. Durch die „Enforce Threshold“ Funktion, die in diesem Fall angewählt wurde, werden schwächere Treffer des Motivs eliminiert, so dass die Tabelle nur 18 von insgesamt 27 Treffern aufführt. (Die Konsensus-Sequenz für das Motiv wird jedoch auf der Grundlage aller 27 Treffer erstellt.) Die Treffer sind in der Liste nach dem jeweiligen Informationsgehalt (information content) als Maß für die Signifikanz des Motivs sortiert.

Wie in Abbildung 5.8. B zu sehen, lässt sich die Lage dieser Treffer in den einzelnen Sequenzen in einer Übersichtsgraphik schematisch darstellen. Die Treffer 1-5 mit dem höchsten Informationsgehalt sind von der Position und der Orientierung, sowie von der Sequenz, besonders hoch konserviert (bis hin zu *D. pseu.*). Die anderen weniger

signifikanten Treffer des Motivs sind von der Position nicht gut konserviert und eher zufällig verteilt. Eine Ausnahme bilden einzig Nummer 9 und 10, die in *D. mel.* und *D. errec.* von der Position und der Sequenz her identisch sind.

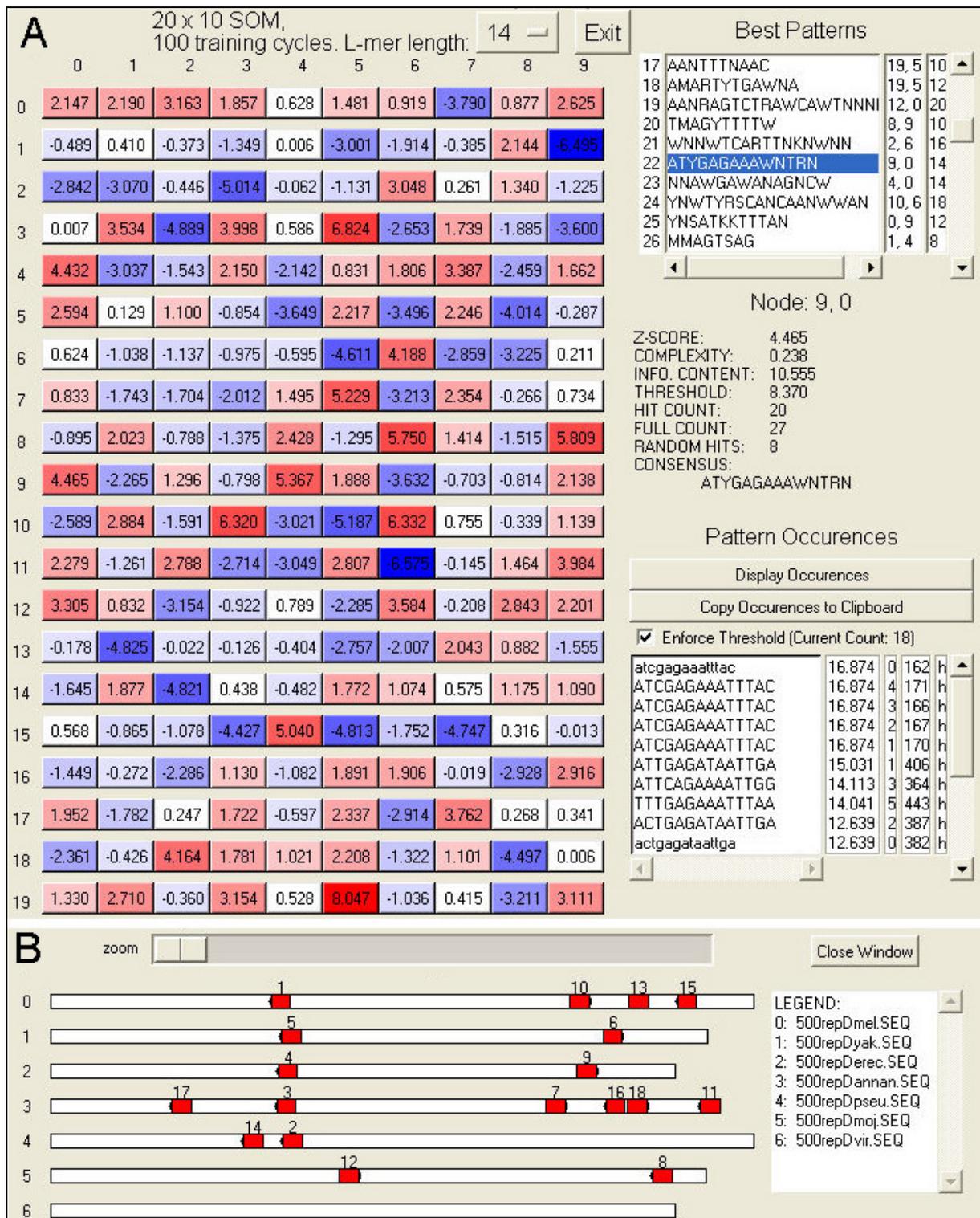


Abbildung 5.6.: SOMBRERO - Darstellung der Resultate durch den *SOMBRERO results viewer*.

Obwohl SOMBRERO als Kommandozeilen gesteuertes Programm etwas komplizierter in der Bedienung ist und eine gewisse Einarbeitung erfordert, ist die Darstellung der Ergebnisse sehr benutzerfreundlich gestaltet und die automatisierte Vorauswahl der signifikantesten Motive hält den Output in einem praktikablen Rahmen.

WeederH

WeederH stellt eine Weiterentwicklung des Weeder Algorithmus dar, der speziell für die Identifizierung von Motiven in einer Reihe von Sequenzen co-regulierter Gene entwickelt wurde (Pavesi et al., 2004). Diese ursprüngliche Programm-Version hat in einer vergleichenden Studie von 13 Motiv-Vorhersage-Programmen die besten Resultate erbracht (Tompa et al., 2005). Die von uns eingesetzten Sequenzen sind im Ergebnisteil aufgeführt. WeederH verlangt außerdem noch eine konkrete Angabe zur genomischen Lage der eingesetzten Sequenzen (upstream-Sequenzen in unserem Fall).

Die von WeederH identifizierten Motive lassen sich als track im UCSC Genome Browser anzeigen (Abb. 5.7.). In der Abbildung ist auch der bereits vorgestellte Konservierungs-track mit angewählt, in der oberen Hälfte ist die Lage der identifizierten Motive durch Balken markiert, dabei zeigt die dunkelste Schattierung die höchste Signifikanz an. Eine Liste der ermittelten Motive wird außerdem als Text-Datei zur Verfügung gestellt, sortiert nach der von WeederH ermittelten Signifikanz der Motive. Für eine Abschätzung der Signifikanz eines Motivs gibt WeederH für jedes Motiv eine Punktzahl an, die auf der Grundlage verschiedener statistischer Werte (z.B. Hintergrund-Häufigkeit, erwartete Treffer) kalkuliert wird. In der Abbildung sind die fünf besten Motive entsprechend beschriftet. Mit besonders hohen Punktzahlen stechen Motiv 1 (39.1438) und 2 (19.0047) hervor (der Wert für Motiv 3 liegt bei unter 10).

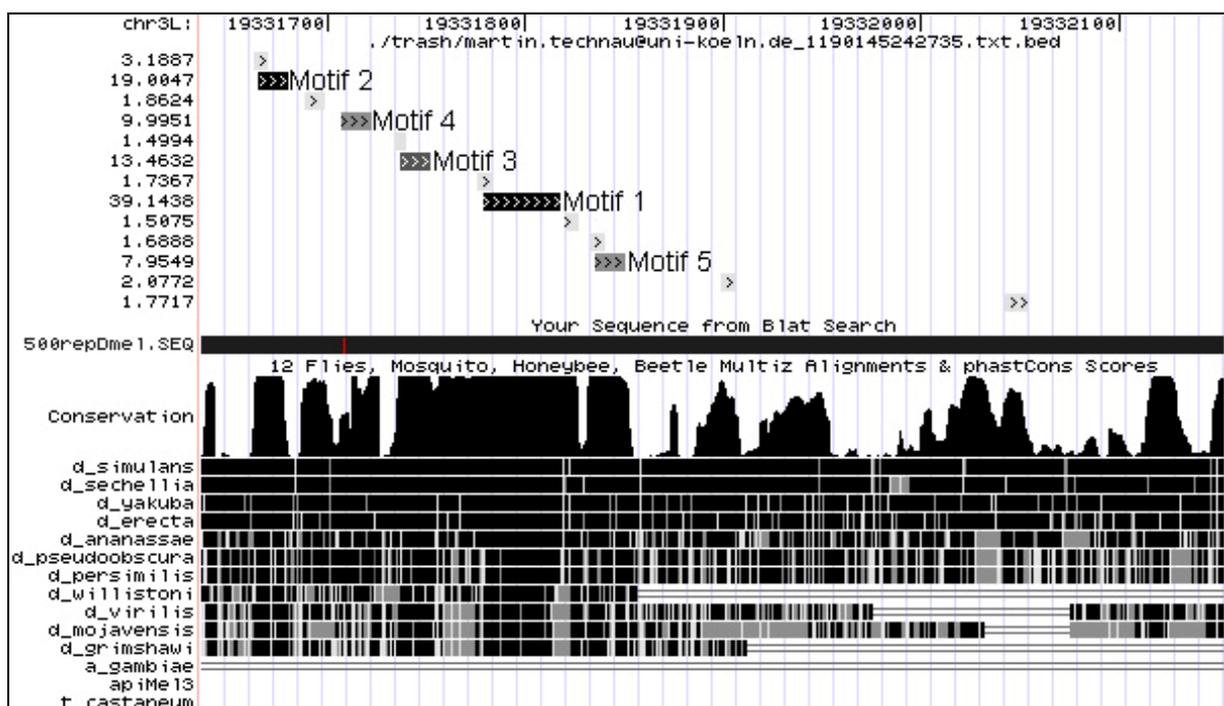


Abbildung 5.7.: WeederH - Darstellung der Ergebnisse im UCSC Genome Browser.

Die Bedienung von WeederH ist sehr einfach. Die Ergebnisse werden zwar nur in sehr simpler Form präsentiert, aber die Möglichkeit der Anzeige im UCSC Genome Browser gestattet dafür weitere Informationen, wie zum Beispiel Daten bezüglich der Konservierung, parallel anzuzeigen. Leider gibt WeederH keine Konsensus-Sequenzen für die ermittelten Motive an, so dass diese gegebenenfalls selbst erstellt werden müssen.

Zusammenfassung

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Teil befasst sich mit der Transkriptionsregulation des Gens *pipe*, dessen spezifische Expression in ventralen Follikelzellen der Eikammer für die Bildung der dorsoventralen Achse des *Drosophila*-Embryos entscheidend ist. Die Repression der *pipe* Expression in dorsalen Follikelzellen hängt von der Aktivierung des EGF-Rezeptors durch den, in der Oocyte asymmetrisch lokalisierten, TGF- α artigen Liganden Gurken ab. Der Einfluss verschiedener Kandidaten der *pipe* Transkriptionsregulation wurde von uns mittels klonaler Analyse getestet. Dabei zeigte sich, dass alle EGFR-regulierten Transkriptionsfaktoren, für die eine mögliche Rolle bei der Kontrolle der *pipe* Expression vermutet worden ist, nicht für die EGFR-Signal vermittelte, dorsale Repression von *pipe* verantwortlich sind. Parallel zu diesen Experimenten wurde die *cis*-regulatorische Region von *pipe* außerdem mit Hilfe bioinformatischer Methoden, basierend auf der evolutionären Konservierung funktionaler Elemente (phylogenetic footprinting), sowie durch die Analyse einer Reihe von Promotor-Reporter-Konstrukten untersucht. Dadurch konnten wir ein *cis*-regulatorisches Element von 31bp identifizieren, welches für die dorsale Repression von *pipe* eine essentielle Rolle spielt. In Gelretardationsexperimenten konnten wir *in vitro* eine spezifische Bindung von Proteinen aus Extrakten von Ovarien an dieses Element nachweisen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Analyse der KASH (Klarsicht/Anc-1/Syne Homologie)- und SUN (Sad1/UNC-84)-Domänen-Proteine in *Drosophila*. KASH-Domänen-Proteine anderer Organismen lokalisieren an der äußeren Kernmembran und spielen unter anderem eine Rolle bei der Verknüpfung des Zellkerns mit Cytoskelett-Elementen; wir waren daher insbesondere an einer möglichen Funktion dieser Proteine bei der Kernpositionierung in der Oogenese interessiert. In *C elegans* und in Vertebraten hängt die Membran-Lokalisation der KASH-Proteine von einer direkten Interaktion mit den SUN-Proteinen ab, die in der inneren Kernmembran lokalisiert sind. In *Drosophila* findet man zwei KASH-Proteine, Msp-300 und Klarsicht (Klar), sowie zwei SUN-Proteine CG18584/CG3287 (auch Klaroid, Koi) und CG6589, von denen CG6589 jedoch nur in Männchen exprimiert wird. Bisher ist nur Klar intensiv untersucht worden, welches unter anderem eine Rolle bei der Kernwanderung während der Augenentwicklung spielt. Wir haben Deletionen von Msp-300 und CG18584/CG3287 generiert. Die Gesamtdelation von Msp-300 führt zu larvaler Letalität, Teildelationen deuten darauf hin, dass Msp-300-Protein-Isoformen ohne eine KASH-Domäne in *Drosophila* eine essentielle Funktion haben. Msp-300 und Klar werden während der Oogenese exprimiert und lokalisieren in den Nährzellen und der Oocyte an der Kernhülle. Der gleichzeitige Funktionsverlust beider KASH-Proteine hat jedoch keine Auswirkungen auf die Oogenese. Damit konnten wir eine frühere Veröffentlichung widerlegen, die eine Funktion von Msp-300 bei der Positionierung der Nährzellkerne aufzeigt. Die Deletion des SUN-Homologs CG18584/CG3287 führt zu einem Verlust der Kernmembran-Lokalisation beider KASH-Proteine. Die Funktion der SUN-Proteine bei der Lokalisation der KASH-Proteine ist somit auch in *Drosophila* konserviert. Die Deletion des SUN-Domänen-Homologs ist semilethal und homozygote Fliegen zeigen einen *klar*-identischen Augenphänotyp, die Oogenese ist in homozygoten Weibchen jedoch nicht betroffen. Auch CG18584/CG3287 hat somit keine essentielle Funktion in der Oogenese.

Abstract

This thesis is subdivided into two parts. The first part deals with the transcriptional regulation of the gene *pipe*, whose specific expression in the ventral follicle cells of the egg chamber is crucial for the establishment of the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo. The repression of *pipe* in dorsal follicle cells depends on the activation of the EGF receptor (EGFR) in these cells by the TGF- α like ligand Gurken, which is localised asymmetrically inside the oocyte. We have tested the influence of several candidates for the transcriptional regulation of *pipe* via clonal analysis. By these means, we have been able to show that all EGFR regulated transcription factors which have been assumed to play a role in the control of *pipe* expression, are not involved in the EGFR mediated dorsal repression of *pipe*. Parallel to these experiments we have analysed the *cis*-regulatory region of *pipe* by using bioinformatical methods, based on the evolutionary conservation of functional elements (phylogenetic footprinting), and additionally by the analysis of several promoter reporter constructs. This approach led to the identification of a 31 bp *cis*-regulatory element which plays a crucial role in the dorsal repression of *pipe*. In a band shift assay we could demonstrate that proteins from ovarian extracts bind specifically to this element.

The second part of the thesis deals with the analysis of the KASH (Klarsicht/Anc-1/Syne Homologie) and SUN (Sad1/UNC-84) domain proteins in *Drosophila*. KASH domain proteins of other organisms localise to the outer nuclear membrane and play a role among others in the connection of the nucleus with cytoskeletal elements. Thus, we were especially interested in a possible function of these proteins in nuclear positioning during oogenesis. In *C. elegans* and vertebrates the membrane localisation of the KASH proteins depends on a direct interaction with the SUN proteins, which localise at the inner nuclear membrane. In *Drosophila* two KASH proteins - Msp-300 and Klarsicht (Klar) - have been identified, as well as two SUN proteins, namely CG18584/CG3287 (synonym Klaroid, Koi) and CG6589, of which CG6589 is only expressed in males. So far only Klar has been intensively investigated, which plays a role among others in nuclear migration during eye development. We generated deletions of *Msp-300* and *CG18584/CG3287*. The complete deletion of *Msp-300* leads to larval lethality, partial deletions indicate that Msp-300 isoforms without a KASH domain have an essential function in *Drosophila*. Both Msp-300 and Klar are expressed during oogenesis and localise in the nurse cells and the oocyte at the nuclear envelope. However the concomitant loss-of-function of both KASH-proteins has no effect on oogenesis. Thus we could disprove an earlier publication which described a function for Msp-300 in the positioning of the nurse cell nuclei. The deletion of the SUN homolog CG18584/CG3287 leads to the loss of the correct localisation of both KASH proteins at the nuclear membrane. Hence the requirement of the SUN proteins for the localisation of the KASH proteins is conserved in *Drosophila*. The deletion of the SUN domain homolog is semilethal and homozygous flies show an eye phenotype identical to *klar*, however oogenesis is not affected in homozygous females. Thus also CG18584/CG3287 has no essential function in oogenesis.

Danksagungen

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Siegfried Roth für die Betreuung der Arbeit und für die permanente Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Bei Prof. Dr. Maria Leptin möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Prof. Dr. Martin Hülskamp und Dr. Veit Riechmann danke ich für die Übernahme des Vorsitzes und des Beisitzes bei der Disputation. Bei Patrick Kalscheuer und Veit Riechmann bedanke ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Allen jetzigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppen Roth und Riechmann danke ich für die zu jeder Zeit sehr harmonische und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner direkten benachbarten Claudia Wunderlich für die regelmäßige Aufheiterung und moralische Unterstützung, wenn mal wieder ein Experiment nicht so funktionierte wie gewünscht. Special thanks also to the former lab mates Sajith Dass and Bhupendra Shrivage for the wonderful co-operative and often funny lab atmosphere. Oliver Karst danke ich für technische Unterstützung insbesondere bei der Generierung transgener Fliegenstämme und für das Korrekturlesen der Arbeit. Auch Ellen Veit danke ich für die vielfache technische Unterstützung bei den unterschiedlichsten Arbeiten. Bei Iris Riedl bedanke ich mich vor allem für die Hilfe bei der Durchführung von EMSA-Experimenten. Bei Rodrigo Nunes-Fonseca möchte ich mich besonders für die intensive Hilfe bei der bioinformatischen Analyse bedanken. Allen jetzigen und früheren Mitgliedern der *Drosophila*-Arbeitsgruppen aus der Genetik danke ich für die Diskussionsbereitschaft im Rahmen des gemeinsamen Progress-Seminars. Bei Herrn Dr. Eberhard Rudloff bedanke ich mich für die Hilfe bei PC-Problemen. Ich danke den folgenden Personen für die bereitwillige Diskussion teilweise unveröffentlichter Daten: [Bernhard Hampoelz](#) (AG Thomas Lecuit, Inst. Biologie Du Dev. Marseille), Martin Kracklauer (AG Janice Fischer, University of Texas), Michael Welte (University of Rochester). Bei Stefan Wenkel (ehemals AG George Coupland, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln) und Angelike Stathopoulos (California Institute of Technology) bedanke ich mich für hilfreiche Hinweise und Diskussionen bezüglich des Yeast-One-Hybrid Screens, bei Michael Bate (University of Cambridge) für die Hinweise zur Untersuchung des larvalen Muskelsystems. Bei Lutz Köpke bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Barbara für ihr Verständnis und ihre Geduld, sowie ihre Hilfe und Unterstützung, besonders in den letzten anstrengenden Monaten.

Abschließend möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern für die ständige Unterstützung in jeglicher Form über viele Jahre hinweg bedanken.

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 – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Siegfried Roth betreut worden.

Köln, den 11.12.2007

Martin Technau

Teilpublikation:

Shravage, B. V., Altmann, G., Technau, M. and Roth, S. (2007). The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in *Drosophila*. *Development*. **134**, 2261-71. Epub 2007 May 16.

Lebenslauf

- Martin Technau Staatsangehörigkeit: deutsch
geboren am 21.11.1974 in Wermelskirchen
verheiratet, zwei Kinder
erster Wohnsitz: Waldstr. 8A, 42929 Wermelskirchen
- 1981 - 1985 Grundschule Ost in Wermelskirchen
- 1985 - 1994 Städtisches Gymnasiums Wermelskirchen
- 1994 –1995 Zivildienst: Heimstatt Wermelskirchen e.V.
- 1996 –2002 Biologie-Studium an der Universität zu Köln
Diplom-Prüfungsfächer: Entwicklungsbiologie, Genetik, Biochemie
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für
Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
Titel: Dorsoventrale Musterbildung im Follikelepithel des *Drosophila*
Ovars
- Seit Okt. 2002 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für
Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
Titel: Die Transkriptions-Regulation des EGFR-Zielgens *pipe* und Analyse
der KASH- und der SUN-Domänen-Proteine in der Oogenese von
Drosophila melanogaster

Publikationen:

Peri, F., Technau, M. and Roth, S. (2002). Mechanisms of Gurken-dependent *pipe* regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development*. **129**, 2965-75.

Shravage, B. V., Altmann, G., Technau, M. and Roth, S. (2007). The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in *Drosophila*. *Development*. **134**, 2261-71. Epub 2007 May 16.