

**Transkriptionelle Regulation von *pipe*
und
dessen Einfluss auf die dorsoventrale Musterbildung
in *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Meike Knispel

aus Münster

Köln, 2012

Berichtersteller:

Prof. Dr. Siegfried Roth
Prof. Dr. Günter Plickert

Tag der mündlichen Prüfung:

03.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Oogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2	Festlegung der Körperachsen während der Oogenese.....	1
1.3	Der EGFR-Signalweg in <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.4	EGFR-abhängige transkriptionelle Regulation von <i>pipe</i>	4
1.5	Aufbau und Analyse der <i>cis</i> -regulatorischen Region des <i>pipe</i> -Gens.....	5
1.6	Funktion des <i>pipe</i> -Gens.....	7
1.7	Die Signalübertragung im Perivitellinspalt.....	8
1.8	Dorsoventrale Musterbildung im Embryo.....	10
1.9	Musterbildung im Embryo.....	12
1.10	Fragestellung/Zielsetzung.....	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Allgemeine Reagenzien und Ausrüstung.....	17
2.1.2	<i>Drosophila melanogaster</i> Fliegenstämme.....	17
2.1.3	Antikörper.....	19
2.1.4	Oligonukleotide/PCR-Primer.....	19
2.1.5	Plasmide.....	22
2.1.6	Zellkultur-Materialien.....	23
2.1.7	Software.....	23
2.1.8	Mikroskopie.....	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Arbeiten mit Fliegen.....	24
2.2.1.1	Keimbahn-Transformation.....	24
2.2.1.2	Induktion von Keimbahnklonen.....	24
2.2.1.3	Uniforme <i>pipe</i> -Expression.....	25
2.2.1.4	Fixierung von Embryonen.....	25
2.2.1.5	Anfertigung von Eihüllen- und embryonalen Kutikula-Präparaten.....	25
2.2.1.6	Präparation und Fixierung von Ovarien.....	25
2.2.1.7	Antikörper-Färbung an Ovarien.....	26
2.2.1.8	Herstellung von Sonden für <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	26
2.2.1.9	<i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	27
2.2.1.10	Fluoreszente <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	28
2.2.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	29

2.2.2.1	Klonierung der <i>pipe-LacZ</i> Reporterkonstrukte	29
2.2.2.2	Klonierung der GFP-Fusionskonstrukte	29
2.2.2.3	Klonierung des Pipe-IRES-GFP-Konstrukts.....	31
2.2.2.4	Klonierung der Promotorkonstrukte für Zellkultur.....	31
2.2.3	Zellkultur.....	32
2.2.3.1	Revitalisierung der S2-Zellen	32
2.2.3.2	Kulturbedingungen	32
2.2.3.3	Subkultivierung.....	32
2.2.3.4	Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau.....	33
2.2.3.5	Subkultivierung für transiente Kotransfektion.....	33
2.2.3.6	Transiente Kotransfektion	33
2.2.3.7	Antikörperfärbung an S2-Zellen	34
2.2.3.8	Statistische Auswertung.....	34
2.2.4	Biochemische Methoden	35
2.2.4.1	Proteinextraktion aus S2-Zellen	35
2.2.4.2	Proteinextraktion aus Ovarien.....	35
2.2.4.3	DNA-Affinitätschromatographie.....	35
2.2.4.4	SDS-PAGE.....	36
2.2.4.5	Western-Blot und Protein-Detektion.....	37
2.2.5	Analyse der <i>cis</i> -regulatorischen Region von <i>pipe</i>	37
2.2.6	Analyse der 3'-UTR von <i>pipe</i>	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Visualisierung der <i>pipe</i>-Expression mittels eines EGFP-Pipe-Fusions-	
	konstrukts	39
3.1.1	Nachweis der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins	39
3.1.2	Vergleich der mRNA- und Fusionsprotein-Verteilung	41
3.2	Post-transkriptionelle Regulation von <i>pipe</i> durch microRNAs	44
3.2.1	Identifizierung potentieller <i>pipe</i> 3'-UTR bindender microRNAs.....	45
3.2.2	Expression der Kandidaten-microRNAs in Embryonen und Ovarien	46
3.2.3	Deletion der microRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR von <i>pipe</i>	48
3.3	Analyse der transkriptionellen Regulation von <i>pipe</i>.....	50
3.3.1	Eine Isolierung des <i>pipe</i> -Repressors mittels DNA-Affinitätschromatographie war nicht möglich	50
3.3.2	Einfluss der ETS-Transkriptionsfaktoren auf die <i>pipe</i> -Expression	50
3.3.3	Überexpression von Yan ^{act} modifiziert die <i>pipe</i> -Expression	51
3.3.4	Expression der Ets-Gene im Follikelepithel.....	53
3.3.5	RNAi-Experimente.....	53
3.4	Weitergehende Charakterisierung des <i>pipe</i>-Promotors	55
3.4.1	Promotor-Analyse.....	55
3.4.2	Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen	57

3.4.3	Reporterassay in Zellkultur zur Charakterisierung der potentiellen Repressorelemente.....	59
3.4.4	Funktionelle Charakterisierung des erweiterten Repressorelements <i>in vivo</i>	62
3.5	Einfluss der <i>pipe</i>-Expression auf die embryonale Musterbildung.....	63
3.5.1	Uniforme Expression von <i>pipe</i> führt zur Lateralisierung.....	64
3.5.2	Uniforme Expression von <i>pipe</i> führt zum Verlust der Bilateralsymmetrie	65
3.5.3	Analyse der Treiberlinienexpression	67
3.5.4	Etablierung einer <i>in-situ</i> -Hybridisierung zur simultanen Analyse der Dorsal-Zielgene <i>snail</i> und <i>rhomboid</i>	68
3.5.5	Asymmetrische <i>pipe</i> -Expression ist nicht notwendig für die Initiierung der DV-Achsenpolarität	68
3.5.6	Asymmetrische <i>pipe</i> -Expression ist nicht ausreichend für die Initiierung der DV-Achsenpolarität	74
3.5.7	Etablierung eines Vitellinmembranmarkers zur Detektion von Follikelzellklonen....	76
3.5.8	Kloninduktion.....	78
3.5.9	Einfluss der Klon-Größe und -Position auf die dorsoventrale Musterbildung im Embryo.....	78
3.5.10	Stabilisierung und Etablierung des ventralen Pols durch laterale Inhibition	81
4	DISKUSSION	86
4.1	Reporter-Konstrukte zur Visualisierung der <i>pipe</i> -Expression	86
4.2	Post-transkriptionelle <i>pipe</i> -Regulation.....	88
4.3	<i>Motiv B</i> respektive die <i>IBS</i> ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Vermittlung der dorsalen <i>pipe</i> -Repression	90
4.4	Mirror als EGF-regulierter transkriptioneller Repressor von <i>pipe</i>	91
4.5	Identifizierung weiterer potentieller <i>cis</i> -regulatorischer Elemente auf Grundlage der Sequenzkonservierung.....	93
4.6	Identifizierung von TFBS mittels verschiedener Vorhersage-Programme.....	94
4.7	Ein Ets-verwandtes Gen ist möglicherweise an der transkriptionellen Regulation von <i>pipe</i> beteiligt	95
4.8	Funktion und evolutionäre Bedeutung von <i>pipe</i>	97
4.9	Ziel der uniformen <i>pipe</i> -Expression.....	98
4.10	Etablierung des Dorsal-Gradienten entlang der DV-Achse	100
4.11	Etablierung des Dorsal-Gradienten durch laterale Inhibition.....	101
4.12	Das „selbst-organisierende“ Transport-Modell (<i>self-organized shuttling</i>)	103

5	LITERATURVERZEICHNIS	108
6	ANHANG.....	122
	ZUSAMMENFASSUNG	130
	ABSTRACT	132
	DANKSAGUNG.....	133
	ERKLÄRUNG.....	134
	LEBENS LAUF.....	135

Abkürzungen

<i>aop</i>	<i>anterior open</i> (Yan)
AP	Alkaline Phosphatase
AP	anteriorposterior
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
β-Gal	β-Galactosidase
C106	C-terminales Spätzle-Fragment
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
<i>Cf2</i>	<i>Chorion factor 2</i>
<i>cic</i>	<i>capicua</i>
CRM	<i>cis</i> -regulatorisches Modul
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DV	dorsoventral
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
<i>F</i>	<i>Forward</i>
FBS	Fetal Bovine Serum
<i>gd</i>	<i>gastrulation defective</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
<i>grk</i>	<i>gurken</i>
HL	Hybridisierungslösung
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hsFLP	Heat shock Flipase
<i>IBS</i>	Iroquois-Bindestelle
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
<i>LacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase

MeOH	Methanol
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
MT	Mikrotubuli
NGS	Normal Goat Serum
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBT	PBS mit X-Triton/Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>pip</i>	<i>pipe</i>
PVS	Perivitellinspalt
R	<i>Reverse</i>
RFP	Red Fluorescent Protein
<i>rho</i>	<i>rhomboïd</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S2	Schneider 2
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
<i>sna</i>	<i>snail</i>
<i>sog</i>	<i>short gastrulation</i>
<i>spz</i>	<i>spätzle</i>
SSC	Saline Sodium Citrate
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindestelle
TGF α	Transforming Growth Factor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
UAS	Upstream Activating Sequence
UTR	Untranslated Region (untranslatierte Region)
VML	Vitelline membrane-like
<i>w</i>	<i>white</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Die paarigen Ovarien von *Drosophila melanogaster* bestehen aus jeweils 15-16 Ovariolen (Lin and Spradling (1993)). Die Entwicklung der einzelnen Eikammern beginnt im Germarium, welches die Stammzellen der Keimbahn sowie der Follikelzellen enthält (Abbildung 1. 1).

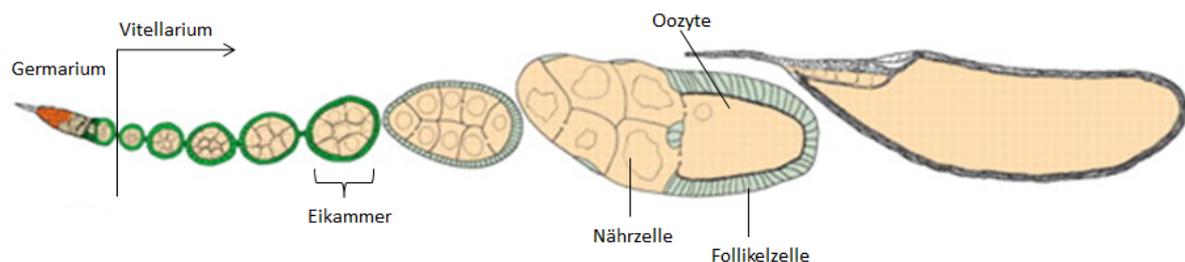


Abbildung 1. 1: Schematische Darstellung einer Ovariole von *Drosophila melanogaster*. Die Oogenese beginnt im Germarium und durchläuft 14 Stadien bis ein reifes Ei entsteht (modifiziert nach (Spradling, Fuller et al. 2011)).

Durch die asymmetrische Teilung einer Keimbahn-Stammzelle werden eine neue Stammzelle sowie eine Zystoblaste gebildet (Lin and Spradling 1993). Nach vier unvollständigen mitotischen Teilungen der Zystoblaste bleiben die resultierenden 16 Zellen durch Zytoplasmabrücken miteinander verbunden (Margolis and Spradling 1995; Robinson and Cooley 1996). Während sich eine dieser Zellen zur Oozyte entwickelt, werden die verbleibenden 15 Zellen zu polyploiden Nährzellen, die große Mengen an RNAs und Proteinen produzieren und die diploide Oozyte über Zytoplasmabrücken hiermit versorgen (Bastock and St Johnston 2008). Die Nährzellen und Oozyte werden im Laufe der Oogenese, die in 14 Entwicklungsstadien unterteilt wird, von maternalen Follikelzellen umgeben. Diese sind neben der Synthese der Eihülle, bestehend aus Vitellinmembran und Chorion (Pascucci, Perrino et al. 1996), maßgeblich an der Etablierung der Körperachsen beteiligt (Poulton and Deng 2007).

1.2 Festlegung der Körperachsen während der Oogenese

Die zwei Hauptkörperachsen werden im Laufe der Oogenese durch die Interaktion der Oozyte mit den sie umgebenden Follikelzellen festgelegt. Der Oozytenkern sowie die mit diesem assoziierte *grk* mRNA sind am posterioren Kortex der Oozyte lokalisiert. Nach Translation der *grk* mRNA wird das Gurken-Protein, ein TGF α -Homolog (Transforming Growth Factor α) (Neuman-Silberberg and Schubach 1993), über die Membran sezerniert und bindet als Ligand an den im Follikelepithel exprimierten EGF (Epidermal Growth Factor)

-Rezeptor Torpedo (Gonzalez-Reyes, Elliott et al. 1995). Die Aktivierung des EGFR-Signalwegs in den anliegenden terminalen Follikelzellen führt dazu, dass diese als posteriore Follikelzellen determiniert werden. Die Zellen senden daraufhin ein noch unbekanntes Signal zur Oozyte zurück, welches die Reorganisation des Mikrotubulinnetzwerks (MT-Netzwerk) bewirkt (Roth 2003; Januschke, Gervais et al. 2006). Das repolarisierte MT-Netzwerk ermöglicht nun die Lokalisierung der *bicoid* mRNA am anterioren und der *oskar* mRNA am posterioren Pol der Oozyte und hierdurch die Etablierung der anteriorposterioren Achse (Cha, Koppetsch et al. 2001; Kugler and Lasko 2009; Roth and Lynch 2009).

Daraufhin wird der Oozytenkern durch polarisierte Mikrotubuli an seine finale Position am anterioren Kortex geschoben und nicht wie lange Zeit angenommen mit Hilfe von Dynein an diesen Mikrotubuli entlang gezogen (Thio, Ray et al. 2000; Zhao, Graham et al. 2012). Die um den nun anterior-dorsal liegenden Nukleus lokalisierte *grk* mRNA wird hier erneut translatiert und aktiviert durch die Bindung an den Rezeptor Torpedo (Price, Clifford et al. 1989) den EGFR-Signalweg in angrenzenden Follikelzellen, welche dadurch als dorsale Follikelzellen spezifiziert werden (Gonzalez-Reyes, Elliott et al. 1995; Queenan, Ghabrial et al. 1997). Alle verbleibenden Zellen, die kein EGF-Signal empfangen, nehmen eine ventrale Identität an und exprimieren *pipe*, welches für die Übertragung der dorsoventralen Polarität der Eikammer auf den Embryo verantwortlich ist (Sen, Goltz et al. 1998; Peri, Technau et al. 2002).

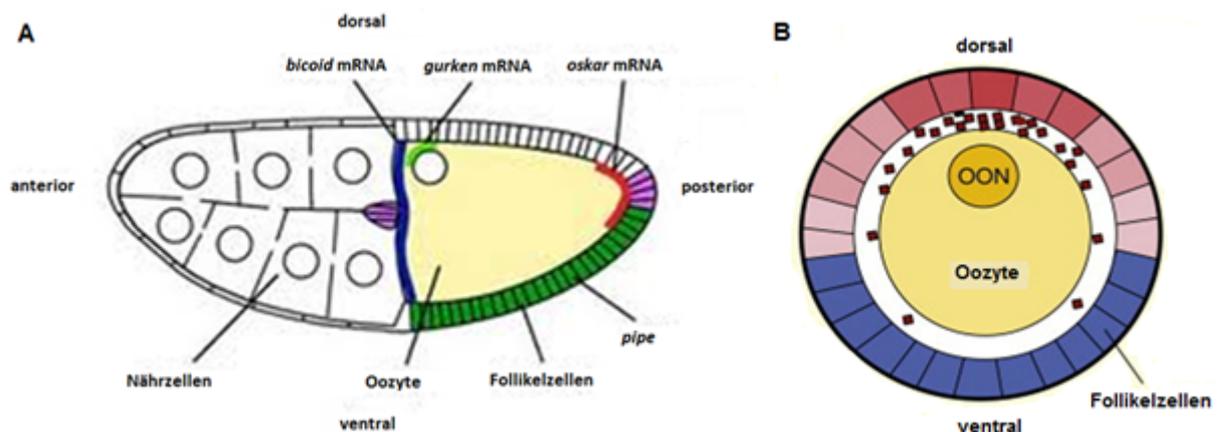


Abbildung 1. 2: Schematische Darstellung einer Eikammer von *Drosophila* im Stadium 10A und eines Querschnitts durch eine Eikammer im Stadium 9 mit den darin lokalisierten Signalen, welche die zwei Hauptkörperachsen festlegen (A) Die mRNAs von *bicoid* (blau) und *oskar* (rot) sind anterior respektive posterior in der Eikammer lokalisiert und etablieren die anteriorposteriore Achse, während die um den Oozytenkern lokalisierte *gurken* mRNA (grün) die dorsale Seite spezifiziert. *pipe* (dunkelgrün) wird in ventralen Follikelzellen exprimiert (St Johnston 2001). (B) Gurken (rote Punkte) wird dorsal im Bereich des Oozytenkerns (OON) sezerniert und aktiviert den EGFR-Signalweg (rot-Gradient) in den darüber liegenden Follikelzellen, *pipe* wird in ventralen Follikelzellen (blau), die kein Gurken-Signal empfangen, exprimiert (Schupbach 2009).

1.3 Der EGFR-Signalweg in *Drosophila melanogaster*

Der hoch konservierte EGFR- (Epidermal Growth Factor Receptor) Signalweg ist an der Kontrolle fundamentaler Prozesse wie dem Zellzyklus, Zellwanderung, -proliferation und -differenzierung oder auch dem Zellstoffwechsel beteiligt (Schlessinger 2000). Während der Oogenese übernimmt er eine zentrale Rolle bei der Festlegung beider Hauptkörperachsen. Der in den Follikelzellen exprimierte EGF-Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) (Freeman 1998; Schlessinger 2000) und ist wie die meisten Mitglieder dieser Protein-Familie als inaktives Monomer in der Plasmamembran lokalisiert. Die Bindung eines Liganden induziert eine Konformationsänderung und in Folge dessen eine Dimerisierung der Rezeptor-Monomere, was die Auto- und Transphosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen ermöglicht (Schlessinger, Ullrich et al. 1988; Yarden and Ullrich 1988; Lemmon and Schlessinger 1994). Während die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor sehr spezifisch ist, ist der intrazellulär ablaufende Signaltransduktionsweg der meisten RTKs identisch (Lemmon and Schlessinger 1994; Bar-Sagi and Hall 2000). Phosphorylierte Tyrosin-Reste der RTKs fungieren als Bindestellen für SH2- (Src Homology 2) oder PTB- (Phosphotyrosine Binding) Domänen verschiedener Signal- und Adaptorproteine (Hunter 1998; Hunter 1998; Schlessinger 2000). In *Drosophila* bindet das Adaptorprotein DRK (Downstream of Receptor Kinase) Phosphotyrosine der RTK und rekrutiert dann den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS (Son of Sevenless). Die Bindung des DRK-SOS Komplexes an den phosphorylierten EGF-Rezeptor bewirkt die Aktivierung von SOS (Zarich, Oliva et al. 2006). Dieses katalysiert nun den Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat) des G-Proteins Ras, welches nun das Effektorprotein Raf aktiviert und dessen Lokalisierung an der Plasmamembran bewirkt (Kolch 2000; Avruch, Khokhlatchev et al. 2001). Raf phosphoryliert und aktiviert die MAPKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase) und diese wiederum ebenfalls durch Phosphorylierung die MAPK, auch als ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) bezeichnet. ERK phosphoryliert eine Vielzahl zytoplasmatischer und membrangebundener Substrate (Alvarez, Northwood et al. 1991; Northwood, Gonzalez et al. 1991; Ciapponi, Jackson et al. 2001). Daneben kann ERK im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren wie die ETS-Domänen-Transkriptionsfaktoren Yan und Pointed (Gabay, Scholz et al. 1996; Rohrbaugh, Ramos et al. 2002; Tootle and Rebay 2005), die Zink-Finger-Proteine Tramtrack (Ttk) (Read and Manley 1992) und Chorion Factor 2 (CF2) (Shea, King et al. 1990; Hsu, Bagni et al. 1996), das HMG- (High Mobility Group) Box-Protein Capicua (Goff, Nilson et al. 2001) oder den Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Mirror (Jordan, Clegg et al. 2000; Zhao, Woolner et al. 2000) phosphorylieren und diese so aktivieren oder deaktivieren (Schlessinger 2000).

1.4 EGFR-abhängige transkriptionelle Regulation von *pipe*

Die Aktivierung des EGFR-Signalwegs in dorsalen Follikelzellen der Eikammer führt zur transkriptionellen Repression von *pipe*. Dieses Gen wird im Stadium 10 der Oogenese in einem durchgehenden, ventralen Streifen, der 40% des Umfangs der Eikammer entspricht, exprimiert (Sen, Goltz et al. 1998; Peri, Technau et al. 2002).

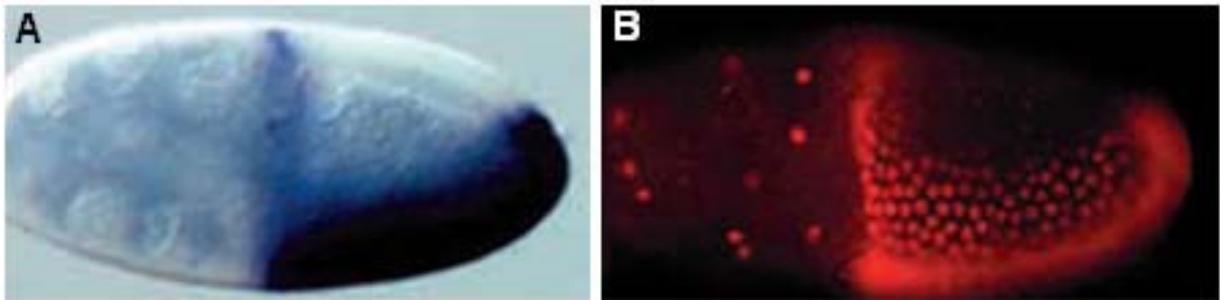


Abbildung 1.3: Expression der *pipe* mRNA und eines *pipe* Reporterkonstrukts im Follikel epithel während des Stadium 10 der Oogenese (A) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der *pipe* mRNA-Lokalisation im Follikel epithel. (B) Visualisierung der *pipe::LacZ*-Expression mit Hilfe einer anti-β-Galactosidase-Antikörperfärbung (modifiziert nach (Peri, Technau et al. 2002)).

Die Region hoher EGFR-Aktivität ist auf etwa 30% der dorsalen Follikelzellen beschränkt und durch die Aufnahme von Grk-Protein in Vesikeln gekennzeichnet (Peri, Bokel et al. 1999). Das Aktivitätsmaximum des EGFR-Signalwegs ist jedoch weit von der Grenze der ventralen *pipe*-Expression entfernt. Daher wurde anfangs ein indirekter Einfluss des EGFR-Signalwegs auf die *pipe*-Regulation und eine Beteiligung des Notch-Signalwegs (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999) angenommen (Jordan, Clegg et al. 2000). Der Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Mirror wird in dorsalen Follikelzellen, welche dem Grk-Signal ausgesetzt sind, exprimiert und beschränkt die Expression von Fringe auf ventrale Zellen (Jordan, Clegg et al. 2000; Zhao, Woolner et al. 2000). Entlang der Grenze der Fringe-Domäne könnte die Aktivierung des Notch-Rezeptors zur Produktion eines diffusionsfähigen Moleküls führen, welches *pipe* reprimiert.

Antikörperfärbungen zeigen aber auch, dass Gurken einen weitreichenden Morphogen-Gradienten bildet, der überraschenderweise sogar bis zur ventralen Seite der Eikammer reicht (Pai, Barcelo et al. 2000; Chang, Liou et al. 2008). Auch in ventralen Zellen, in denen *pipe* exprimiert wird, scheint demnach der EGF-Rezeptor aktiviert zu werden. In diesen ventralen Follikelzellen wird die Aktivität des Signalweges wiederum durch Cbl vermindert (Pai, Barcelo et al. 2000), indem der aktivierte EGF-Rezeptorkomplex wahrscheinlich dem Ubiquitin-abhängigen Proteinabbauweg zugeführt wird (Miyake, Luper et al. 1997; Levkowitz, Waterman et al. 1998; Joazeiro, Wing et al. 1999; Levkowitz, Waterman et al. 1999; Yokouchi, Kondo et al. 1999). Da die ektopische Aktivierung des EGF-Signalwegs in

ventralen Cbl-mutanten Zellklonen zur zellautonomen Repression von *pipe* führt, wird angenommen, dass Grk als weitreichendes Signalmolekül einen unmittelbaren Einfluss auf die Expression von *pipe* hat. Einen weiteren Hinweis hierauf gibt die dorsale Ausweitung der *pipe*-Domäne in Eikammern mit reduzierter Grk-/EGFR-Aktivität (Morisato 2001; Peri, Technau et al. 2002).

Die Annahme eines direkten Einflusses wird zudem durch die Beobachtung gestützt, dass homozygote *raf*- und *ras*- *loss-of-function* Klone in allen Follikelzellen entlang der gesamten AP-Achse der Eikammern eine zellautonome Derepression von *pipe* bewirken (Peri, Technau et al. 2002). Obwohl Ras und Raf von unterschiedlichen Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden können, schließt die Analyse von Zellklonen, welche mutant für Komponenten des FGF- (Fibroblast Growth Factor) Rezeptor-Signalwegs sind, dessen Beteiligung an der Regulation von *pipe* aus und deutet daraufhin, dass die Repression durch einen für den Grk-/EGFR-Signalweg spezifischen Transkriptionsfaktor kontrolliert wird (Peri, Technau et al. 2002).

Durch Analysen von *loss-of-function* Follikelzellklonen wurde weiterhin gezeigt, dass die vom EGFR-Signalweg kontrollierten ETS-Domänen-Proteine Yan und Pointed sowie die Zink-Finger-Proteine Tramtrack und CF2 nicht für die Repression von *pipe* verantwortlich sind (Technau, Knispel et al. 2012). Hingegen ist der HMG-Box-Transkriptionsfaktor Capicua (Cic) (Goff, Nilson et al. 2001), welcher als Repressor während der Embryogenese (Jimenez, Guichet et al. 2000), der Flügelentwicklung (Roch, Jimenez et al. 2002) und der Musterbildung in Follikelzellen aktiv ist, essentiell für die Aktivierung der *pipe*-Expression (Technau, Knispel et al. 2012). Diese Aktivierung erfolgt jedoch indirekt, indem Cic den Iroquois-Transkriptionsfaktor Mirror reprimiert, der im anterior-dorsalen Teil der Eikammer EGFR-abhängig aktiviert wird und in diesen Zellen die Expression von *pipe* direkt durch die Bindung an ein Repressorelement in dessen Promotor unterdrückt (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012).

1.5 Aufbau und Analyse der *cis*-regulatorischen Region des *pipe*-Gens

Eine 8 kb lange Sequenz rund um den Transkriptionsstart von *pipe* ermöglicht die Expression eines *LacZ*-Reporterkonstrukts in einem Muster, das der Verteilung des endogenen *pipe*-Transkripts entspricht (Sen, Goltz et al. 1998; Peri, Technau et al. 2002). Diese Sequenz besteht aus 3 kb der *cis*-regulatorischen Region vor dem Transkriptionsstart sowie dem ersten Exon des *pipe*-Gens. Das 3 kb lange Promotorfragment allein reicht aus den *LacZ*-Reporter in einem Wildtyp-ähnlichen Muster zu exprimieren (Fuchs, Cheung et al. 2012; Technau, Knispel et al. 2012).

Durch die Deletion proximaler oder distaler Fragmente des *pipe*-Promotors konnte die essentielle Sequenz, die zur korrekten Expression notwendig ist, auf eine Region zwischen -1135 und -985 bp relativ zum Transkriptionsstart eingegrenzt werden (Technau, Knispel et al. 2012). Innerhalb dieser essentiellen Promotorsequenz liegt das in allen zwölf sequenzierten und untersuchten *Drosophiliden*-Genomen stark konservierte Repressorelement *Motiv B*, welches für die dorsale Repression von *pipe* notwendig ist (siehe Abbildung 1. 4) (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012; Technau, Knispel et al. 2012). Erst kürzlich wurde bestätigt, dass die etwas längeren Versionen *r1* (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012) oder *pipMRE* (Fuchs, Cheung et al. 2012) des *Motiv B* mehrere Iroquois-Bindestellen (*IBS*) enthalten, welche *in vitro* vom Transkriptionsfaktor Mirror gebunden werden können. Mutationen der *IBS* im linken Teil des Elements verhindern im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) die Bindung von Mirror an diese DNA-Sequenz (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012).

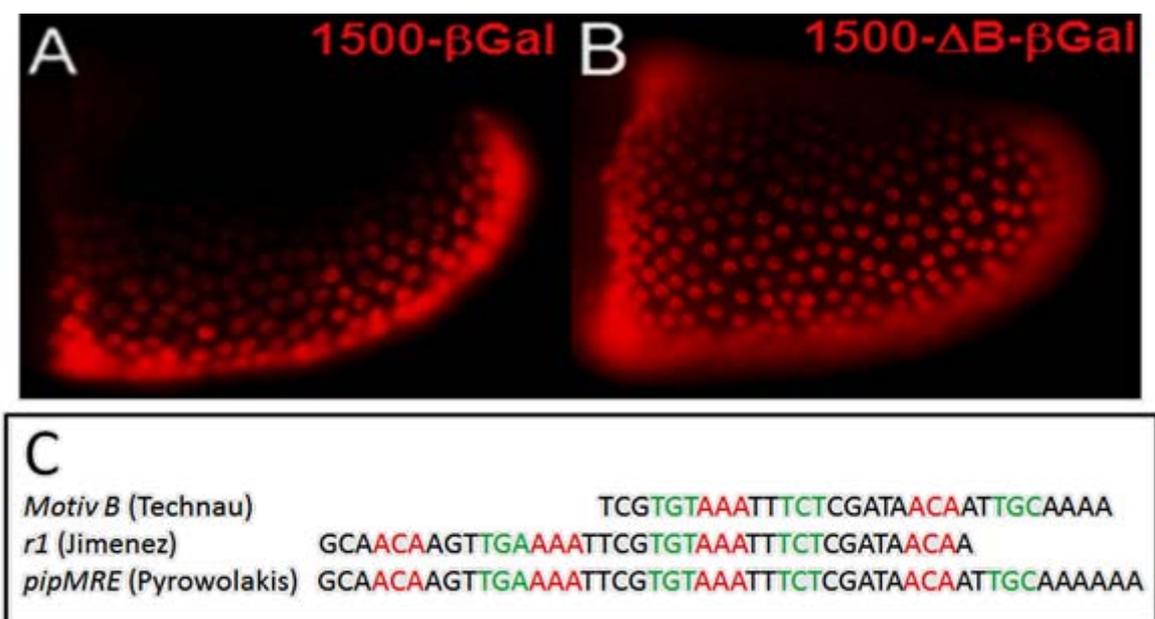


Abbildung 1. 4: Expression des *LacZ*-Reporterkonstrukts im Follikelepithel während des Stadium 10 der Oogenese und Darstellung der Repressorelemente (A) Visualisierung der *LacZ*-Expression unter Kontrolle eines 1500 bp langen Promotor-Konstrukts oder (B) unter Kontrolle des Promotors aus dem das Repressorelement *Motiv B* deletiert wurde mit Hilfe einer anti-β-Galactosidase-Antikörperfärbung. (C) Die Sequenzen der unabhängig voneinander identifizierten Repressorelemente. Die roten und grünen Nukleotide entsprechen jeweils den zwei Hälften der palindromischen Iroquois-Bindestellen (*IBS*: ACANNNTGT).

Weitere bioinformatisch ermittelte Iroquois-Bindestellen liegen bei -1500 bp oberhalb des Transkriptionsstarts und somit außerhalb der Promotor-Region, welche für die *pipe*-ähnliche *LacZ*-Reporterexpression notwendig ist. Diese weiter distal vom essentiellen Promotor

gelegenen *IBS* sind aber allein nicht ausreichend die ektopische Expression von *pipe* in dorsalen Follikelzellen zu unterbinden (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012).

1.6 Funktion des *pipe*-Gens

Der *pipe*-Lokus kodiert für bis zu zwölf verschiedene Protein-Isoformen, welche durch alternatives Spleißen des primären *pipe*-Transkripts generiert werden. Alle Isoformen besitzen eine signifikante Sequenzhomologie zu dem Vertebraten-Enzym Herapansulfat-2-O-Sulfotransferase (Sergeev, Streit et al. 2001). Während alle Isoformen in den embryonalen Speicheldrüsen exprimiert werden, können nur acht Isoformen in den Ovarien nachgewiesen werden. Von diesen ist nur die Isoform Pipe-ST2 essentiell für die dorsoventrale Achsenbildung (Zhu, Sen et al. 2005).

Die Expression der Isoform Pipe-ST2 in *pipe* mutanten Weibchen ermöglicht die Bildung lebensfähiger Nachkommen, die ventrale und laterale Musterelemente aufweisen. Da die dorsale Expression von *pipe* zur Invertierung der embryonalen dorsoventralen Achse führt, scheint die Position der *pipe*-Expression die ventrale Seite der Eikammer und somit die Polarität der dorsoventralen Achse festzulegen (Sen, Goltz et al. 1998).

Für die korrekte subzelluläre Lokalisation des Pipe-Proteins wird die Funktion der Protein-disulfidisomerase Windbeutel benötigt (Konsolaki and Schupbach 1998; Sen, Goltz et al. 2000; Ma, Guo et al. 2003). In COS7-Zellen, in denen *pipe* und *windbeutel* ko-exprimiert werden, zeigt Pipe eine charakteristische perinukleäre Verteilung, welche für dessen Lokalisation im Golgi-Apparat spricht (Sen, Goltz et al. 2000). Diese subzelluläre Lokalisation ist vereinbar mit der vermuteten enzymatischen Funktion als Sulfotransferase (Sen, Goltz et al. 2000; Luders, Segawa et al. 2003; Zhu, Sen et al. 2005). In Protein-Extrakten aus Ovarien transgener Fliegen, die hohe Level von *pipe* exprimieren und mit radioaktiv markiertem Schwefel [³⁵S] gefüttert wurden, können nach SDS-PAGE und Autoradiographie erhöhte Mengen eines sulfatierten Substrates nachgewiesen werden. Das modifizierte VML- (Vitelline membrane-like) Protein ist 578 Aminosäuren lang und trägt am C-Terminus eine 25 Aminosäuren lange Sequenz, die Ähnlichkeiten zu charakteristischen Komponenten der Vitellinmembran der Eihülle aufweist. Am N-Terminus befindet sich ein hydrophobes Signalpeptid, das dafür verantwortlich ist, dass VML von Follikelzellen sezerniert wird, um an der korrespondierenden Position der embryonalen Eihülle inkorporiert zu werden (Zhang, Stevens et al. 2009). Neben VML werden noch weitere Proteine der Vitellinmembran sulfatiert, was auf eine Redundanz der enzymatischen Substrate von Pipe hinweist (Park, Zhang et al. 2008; Zhang, Stevens et al. 2009). Da der Verlust von VML in Fliegen mit hypomorphen *pipe*-Allelen die Penetranz des dorsalisierten Phänotyps erhöht, wird

angenommen, dass mit VML ein biologisches Substrat gefunden wurde, welches die dorsoventrale Musterbildung des Embryos beeinflusst. Möglicherweise dienen die modifizierten Komponenten der ventralen Eihülle als notwendige Ko-Faktoren für die Aktivierung einer oder mehrerer Proteasen im Perivitellinspalt oder ermöglichen deren stabile Lokalisierung (Cho, Stevens et al. 2012). In einem weiteren Szenario sind die sulfatierten Substrate für die Inaktivierung möglicher Inhibitoren der Perivitellin-Proteasen verantwortlich (Zhang, Stevens et al. 2009).

1.7 Die Signalübertragung im Perivitellinspalt

Die im Follikelepithel festgelegte Polarität der dorsoventralen Achse wird in der fortschreitenden Entwicklung über den Perivitellinspalt hinweg auf den Embryo übertragen. In diesem hängt die Etablierung der dorsoventralen Achse von der auf ventrale Zellen beschränkten Aktivierung des uniform in der Plasmamembran eingelagerten Toll-Rezeptors ab (Anderson, Jurgens et al. 1985; Hashimoto, Hudson et al. 1988; Hashimoto, Gerttula et al. 1991). Dessen Ligand Spätzle wird als inaktiver Vorläufer in den Perivitellinspalt sezerniert (Schneider, Jin et al. 1994; DeLotto and DeLotto 1998). Aber nur im ventralen Bereich wird der als Toll-Ligand fungierende C-Terminus von Spätzle durch die Protease Easter prozessiert (Weber, Gangloff et al. 2007; Stein, Charatsi et al. 2010) (Abbildung 1. 5). Eine mit Easter verwandte Protease, das Spätzle-processing enzyme, spaltet Spätzle im Zuge der Immunantwort (Jang, Chosa et al. 2006).

Easter wird im embryonalen Perivitellinspalt durch eine proteolytische Kaskade prozessiert, die aus den Proteasen Nudel, Gastrulation defective und Snake besteht (Dissing, Giordano et al. 2001). Der Protease Nudel, welche uniform verteilt vorliegt, wird eine wichtige Rolle bei der initialen Aktivierung dieser Kaskade zugesprochen (Hong and Hashimoto 1995). Aktiviertes Nudel wird, unabhängig von allen anderen Proteasen, die an der Etablierung der dorsoventralen Polarität beteiligt sind, durch Autoproteolyse seiner Zymogenform symmetrisch im gesamten Perivitellinspalt gebildet. Durch die von Nudel ausgelöste aufeinander folgende Prozessierung und Aktivierung der Proteasen Gastrulation defective (Konrad, Goralski et al. 1998), Snake (DeLotto and Spierer 1986) und Easter (Chasan and Anderson 1989; Chasan, Jin et al. 1992) wird zuletzt der aktive Toll-Ligand C-Spätzle gebildet (Abbildung 1. 5 B).

Die ventrale Lokalisierung der Spätzle-Prozessierung wird durch die vorangegangene Aktivität von Pipe gewährleistet. Da das sezernierte Glykoprotein Nudel in seinem modularen Aufbau Proteinen der extrazellulären Matrix ähnelt, wurde vermutet, dass diese Protease ein Substrat von Pipe darstellen könnte (Hong and Hashimoto 1995). Obwohl proteolytisch

gespaltene Fragmente von Nudel in den Perivitellinspalt sezerniert und hier stabil verankert werden, ist die Expression von *nudel* in ventralen Follikelzellen aber nachweislich nicht notwendig und diese Protease kein Ziel der enzymatischen Sulfotransferase-Aktivität von Pipe (Stein, Cho et al. 2008).

Der erste Schritt der Proteasekaskade, der von *pipe* respektive dessen modifizierten Substraten im ventralen Bereich des Perivitellinspalts abhängt, ist die Proteolyse von Easter durch Snake. Da diese zwei Proteasen in einem Komplex miteinander assoziiert sind, wird angenommen, dass die sulfatierten Pipe-Substrate deren Interaktion durch Konformationsänderungen ermöglichen (Stein, Charatsi et al. 2010). Zusätzlich wird Gastrulation defective im ventralen Perivitellinspalt durch einen *pipe*-abhängigen Prozess lokalisiert, wo es die Spaltung von Easter durch Snake mit Hilfe eines extrakatalytischen Mechanismus fördert (Cho, Stevens et al. 2012).

Die auf ventrale Follikelzellen beschränkte Expression von *pipe* und die somit räumlich begrenzte Sulfotransferase-Aktivität lokalisiert die Serin-Protease-Aktivität im Perivitellinspalt und führt letztlich durch die Produktion des C-terminalen Spätzle-Fragments ausgehend von der ventralen Mittellinie zur graduellen Aktivierung des Toll-Rezeptors im Embryo.

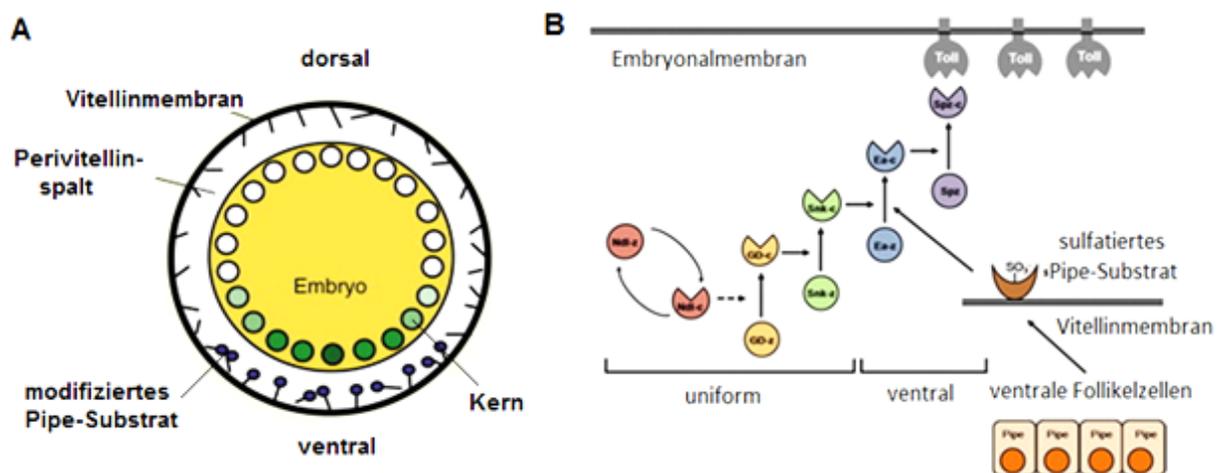


Abbildung 1. 5: Querschnitt durch einen Embryo im synzytialen Blastodermstadium und schematische Darstellung der funktionellen Interaktionen der im Perivitellinspalt lokalisierten Komponenten der Protease-Kaskade (A) Der Signalgradient der zur graduellen Aktivierung des Toll-Rezeptors entlang der embryonalen, dorsoventralen Achse führt und den nukleären Dorsal-Gradienten (grüne Kreise) etabliert, wird im Perivitellinspalt zwischen Embryo und der äußeren Vitellinmembran gebildet (Schupbach 2009). (B) "z" und "c" bezeichnen die Zymogen- respektive die gespaltene, aktive Form von Nudel, Gd, Snake, Easter und Spz. Letzteres bindet als aktive Form C-Spz an den Toll-Rezeptor in der Embryonalmembran. Die vertikalen Pfeile indizieren die Prozessierung der Zymogen-Proteine in die aktiven Produkte. Die horizontalen und diagonalen Pfeile indizieren die Effektoren, welche für die Prozessierung benötigt werden. Die gebogenen Pfeile, die Nudel-z und Nudel-c verbinden, deuten eine Aktivierung der Protease durch Autoprozessierung an; der unterbrochene Pfeil deutet einen Einfluss von Nudel auf die Spaltung von Gd an. Das von den ventralen Follikelzellen sezernierte, modifizierte Pipe-Substrat ermöglicht die Spaltung von Easter durch Snake (Cho, Stevens et al. 2010).

1.8 Dorsoventrale Musterbildung im Embryo

Die Produktion des aktiven und diffusionsfähigen Spätzle-Fragments im ventralen Teil des Perivitellinspalts führt zu einer graduellen Aktivierung des Toll-Rezeptors in der Plasmamembran des Embryos (Stein, Roth et al. 1991; Roth 1993; Roth 1994). In ventralen Zellen ist die Aktivität des intrazellulären Toll-Signalwegs am höchsten, während sie über laterale Zellen hinweg zur dorsalen Seite abnimmt. Die Initiierung des Toll-Signalwegs resultiert in der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors Dorsal, einem Mitglied der NF- κ B/Rel-Familie (Drier and Steward 1997). Zunächst wird Dorsal durch das inhibitorische I κ B-Protein Cactus im Zytoplasma gehalten. Die ventrale Aktivierung des Toll-Rezeptors führt zur Proteolyse von Cactus und der dadurch bedingten Freisetzung von Dorsal, das nun in den Kern gelangen kann (Belvin, Jin et al. 1995; Bergmann, Stein et al. 1996; Reach, Galindo et al. 1996). In fixierten Embryonen kann der Dorsal-Gradient mittels Antikörperfärbungen (Roth, Stein et al. 1989; Liberman, Reeves et al. 2009; Kanodia, Kim et al. 2011), in lebenden Embryonen mit Hilfe der Fusionsproteine Dorsal-GFP (DeLotto, DeLotto et al. 2007; Kanodia, Rikhy et al. 2009) oder Dorsal-Venus (Reeves, Trisnadi et al. 2012) visualisiert werden. Demnach bildet der Dorsal-Gradient ausgehend von der ventralen Mittellinie in einer Region, die 40% des Eiumfanges ausmacht, eine glockenförmige oder Gauss-ähnliche Verteilungskurve (Roth, Stein et al. 1989; Reeves, Trisnadi et al. 2012), welche innerhalb der uniformen *pipe*-Expressionsdomäne liegt. In anderen Studien wird angenommen, dass der Dorsal-Gradient sich sogar über einen Bereich von 60% der dorsoventralen Achse erstreckt oder gar bis zur dorsalen Mittellinie reicht (Kanodia, Rikhy et al. 2009; Bothma, Levine et al. 2010; Kanodia, Kim et al. 2011). In dorsalen Regionen wird der Gradient linear und ist hier durch eine relativ konstante Steigung charakterisiert (Reeves, Trisnadi et al. 2012).

Der Dorsal-Gradient reguliert bis zu 70 Zielgene in einer Konzentrations-abhängigen Weise entlang der dorsoventralen Achse. Unterschiedliche Schwellenwerte legen hierbei die Position und Ausdehnung der Zielgenexpression entlang des Morphogen-Gradienten und der embryonalen Achse fest (vgl. Abbildung 1. 6) (Hong, Hendrix et al. 2008). Die Dorsal-Zielgene können in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Typ 1-Gene werden von hohen Dorsal-Konzentrationen in den ventralsten Zellen entlang der embryonalen Mittellinie aktiviert. Hierzu zählen die Transkriptionsfaktoren *twist (twi)* und *snail (sna)* (Leptin 1991), welche die Entwicklung des Mesoderms determinieren (Thisse, Stoetzel et al. 1988; Jiang, Kosman et al. 1991; Pan, Huang et al. 1991). Typ 2-Gene, zu denen unter anderem *rhomboid (rho)* und *ventral nervous system defective (vnd)* zählen, werden durch mittlere intranukleäre Dorsal-Levels in lateralen Zellen, dem späteren Neuroektoderm, aktiviert. Typ 3-Gene wie *short gastrulation (sog)* und *zerknüllt (zen)* werden durch niedrige Dorsal-

Konzentrationen reguliert. Während eine geringe Konzentration ausreichend ist die Expression von *sog* zu aktivieren, wird die Expression der dorsalen Gene *zen* oder *decapentaplegic (dpp)* im zukünftigen dorsalen Ektoderm reprimiert (Jiang and Levine 1993). Nur in den dorsalen Zellen, in denen Dorsal vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, werden diese Gene exprimiert und determinieren in dieser Region Amnioserosa und dorsales Ektoderm (Rushlow, Doyle et al. 1987; Rushlow, Frasch et al. 1987; Rushlow and Levine 1990).

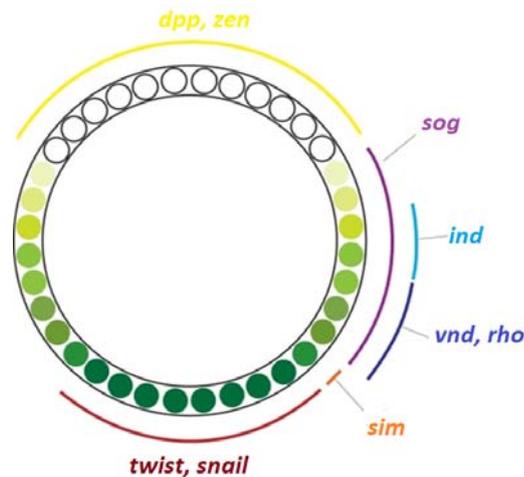


Abbildung 1. 6: Der intranukleäre Dorsal-Gradient und die Expression seiner Zielgene entlang der dorsoventralen Achse des Embryos In ventralen Kernen (dunkelgrüne, gefüllte Kreise) ist die Konzentration des Dorsal-Proteins am höchsten, in lateralen Kernen werden intermediäre Level erreicht (hellgrüne Kreise), während in dorsalen Kernen (weiße Kreise) kein Dorsal-Protein lokalisiert ist sondern nur in dem sie umgebenden Zytoplasma. In der ventralen Region werden die Gene *twi* und *sna*, im lateralen Bereich *sim*, *vnd*, *rho*, *ind* und *sog*, in der dorsalen Region *dpp* und *zen* exprimiert (Hong, Hendrix et al. 2008).

Die Regulation der Expression verschiedener Zielgene entlang der embryonalen dorsoventralen Achse erfolgt nicht nur direkt durch das Auslesen des Dorsal-Gradienten, sondern auch indirekt über die Initiierung weiterer Signalwege oder über den Einfluss der Zielgene aufeinander. Hohe Dorsal-Level aktivieren *twist*, das in einem 16-18 Zellen weiten Streifen entlang der anterioposterioren Achse exprimiert wird (Jiang, Kosman et al. 1991). Der Gradient des *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktors Twist bildet sich innerhalb einer schmalen Region und aktiviert und erhält nun wiederum in Kombination mit Dorsal in einem ventralen Zellstreifen die Expression von *snail* (Ip, Park et al. 1992). Der von *snail* kodierte Zinkfinger-Transkriptionsfaktor wird in einer ventralen Region, die 20% des Embryos umfasst und sich entlang der dorsoventralen Achse mit der *twist*-Domäne deckt, exprimiert und etabliert eine scharfe Grenze zwischen dem zukünftigen Mesoderm und dem neurogenen Ektoderm (Kosman, Ip et al. 1991; Leptin 1991).

Verschiedene Gene, die durch mittlere Dorsal- und Twist-Konzentrationen in lateralen Regionen aktiviert werden, werden durch Snail im Mesoderm reprimiert. Somit flankiert beispielsweise *rho* die ventrale Twist/Snail-Domäne in einem lateralen jeweils 12-14 Zellen weiten Streifen, dem künftigen Neuroektoderm (Francois, Solloway et al. 1994).

Obwohl der Dorsal-Gradient und die Expression der Zielgene räumlich und zeitlich über die Kernteilungszyklen 11-14 des Embryos variabel sind, werden die direkten Dorsal-Zielgene in einem reproduzierbaren Muster aktiviert. *twist* und *snail* markieren jeweils die Region höchster Dorsal-Aktivität, welche während der Embryogenese ausgehend von einer Weite von 20% in frühen Stadien auf bis zu 25% des Eiumfangs in späteren Stadien expandiert. Währenddessen bleibt die Steigung des Gradienten konstant und wird durch eine ebenfalls konstant weite *sog-* oder *rho*-Domäne reflektiert (Reeves, Trisnadi et al. 2012). Die Expression der zygotischen Musterbildungsgene entlang der embryonalen dorsoventralen Achse, welche die verschiedenen Bereiche des Dorsal-Gradienten reflektieren und auf diesem basieren, spezifizieren letztlich die Bildung der Keimblätter entlang der dorsoventralen Achse.

1.9 Musterbildung im Embryo

Die Expression von *pipe* auf der ventralen Seite der sich entwickelnden Eikammer ist ausreichend, um die Bildung der dorsoventralen Achse und des Dorsal-Gradienten zu initiieren (Nilson and Schupbach 1999; Peri, Technau et al. 2002); hierdurch kann aber nicht die Form des embryonalen Dorsal-Gradienten erklärt werden. Entlang der anterior-posterioren Achse wird *pipe* in einer lateral scharf begrenzten Domäne, die 40% des Eiumfanges umfasst, uniform exprimiert. Innerhalb dieser Domäne bildet Dorsal, ausgehend von der ventralen Mittellinie, einen glockenförmigen oder Gauss-ähnlichen Gradienten (Roth, Stein et al. 1989; Reeves, Trisnadi et al. 2012). Die Region der Kerne, welche das Maximum der nukleären Dorsal-Konzentration aufweisen, umfasst nur 20% des Eiumfangs und ist demnach nicht deckungsgleich mit der uniformen *pipe*-Domäne sondern nur halb so weit. Da der Gradient über eine längere Entwicklungsphase in seiner charakteristischen Form stabil ist, kann dessen Bildung als Folge eines einfachen Diffusionsprozess ausgeschlossen werden (DeLotto, DeLotto et al. 2007). Wahrscheinlicher ist, dass kompliziertere Musterbildungsprozesse im Embryo die Form und Position des Dorsal-Gradienten beeinflussen.

Hinweise hierauf geben Beobachtungen, dass sich in Eikammern mit reduzierter Grk- oder EGFR-Aktivität die Region der *pipe*-Expression ausweitet (Morisato 2001). Die resultierenden, ventralisierten Embryonen weisen eine breitere *twist*-Domäne auf und gastrulieren häufig mit zwei Ventralfurchen (Roth and Schupbach 1994). Im Falle einer

Achsenduplikation innerhalb der erweiterten *pipe*-Domäne geht dieser eine entsprechenden Änderung des Dorsal-Gradienten voran, der nun zwei Maxima aufweist, welche durch ein ventrales Minimum, das sich im Laufe der Embryonalentwicklung noch vertieft, getrennt sind (Roth and Schubach 1994). Dies wird auch durch die partielle Aufspaltung der *twist*-Domäne widergespiegelt. Der gleiche Effekt kann durch die Injektion hoher Konzentrationen von *spz*-mRNA in Embryonen im synzytialen Blastodermstadium erreicht werden (Morisato 2001), was darauf schließen lässt, dass die Musterbildungsprozesse nicht im Follikelepithel sondern im Embryo stattfinden. Diese partielle Achsenduplikation und Verfeinerung zeigt, dass der Dorsal-Gradient räumlich und zeitlich dynamisch ist und nicht durch die einfache Diffusion des Morphogens Spätzle erklärt werden kann.

Das Spätzle-Pro-Protein wird als ein dimeres Vorläufer-Protein, das aus einer 25 kDa großen N-terminalen Domäne (N-Spz) sowie einer 14 kD großen C-terminalen Region (C106 oder C-Spz) zusammengesetzt ist, synthetisiert und in den Perivitellinspalt sezerniert (DeLotto and DeLotto 1998; Weber, Gangloff et al. 2007). Das C-terminale Spätzle-Fragment C106 ermöglicht die Dimerisierung der Ektodomänen des Toll-Rezeptors und somit die Aktivierung des intrazellulären Signalwegs (Schneider, Hudson et al. 1991; Mellroth, Karlsson et al. 2005; Weber, Moncrieffe et al. 2005). Die Bindung von C106 an den Toll-Rezeptor wird aber solange durch die N-terminale Domäne verhindert, bis das Pro-Protein Spätzle durch die Protease Easter prozessiert wird (Schneider, Jin et al. 1994; DeLotto and DeLotto 1998). Da bei einer Aufreinigung der N-terminalen Domäne aus embryonalen Extrakten das Fragment C106 nicht mit diesem präzipitierte, wurde angenommen, dass die Spaltprodukte nicht miteinander verbunden bleiben (Schneider, Jin et al. 1994). Weitere *in vitro*-Experimente deuten aber darauf hin, dass die beiden Domänen nach der proteolytischen Aktivierung noch miteinander assoziiert sind (Weber, Gangloff et al. 2007).

Der N-terminalen Domäne wird eine potentielle Rolle als negativer Regulator des Toll-Signalwegs zugeschrieben, der entweder die Aktivität einer Protease der vorgeschalteten Kaskade inhibiert oder direkt die Bindung des Spätzle-C106 an den Rezeptor antagonisiert (Morisato 2001; Chang and Morisato 2002). Gegen diese antagonisierende Wirkung spricht die Beobachtung, dass das isolierte C106-Fragment wie auch der N-Spz/C106-Komplex, in gleichem Maße zur Aktivierung des Toll-Signalweges führen (Weber, Gangloff et al. 2007). Obwohl die exakte Funktion der N-terminalen Domäne noch ungeklärt ist, ist dessen Rolle als diffusionsfähiger Inhibitor im Rahmen eines theoretischen Musterbildungsprozesses - der lateralen Inhibition - eine Erklärung für die beobachtete Achsenduplikation in Embryonen von *grk⁻*-Fliegen (Morisato 2001).

In einem postulierten Reaktions-Diffusion-Modell bindet das C-terminale Spätzle-Fragment C-Spz (C106) relativ schnell an den Toll-Rezeptor und wird so in seiner Diffusion begrenzt.

Die Bildung des Toll-C106-Signalkomplexes bedingt die Abspaltung der noch assoziierten N-terminalen Domäne (Weber, Gangloff et al. 2007). Da die Diffusionsrate dieses, als potentiellen Inhibitor agierenden N-terminalen Spätzle-Fragments, höher ist als die des prozessierten N-Spz/C106-Komplexes, diffundiert es schneller aus dem ventralen Bereich an die lateralen Grenzen der *pipe*-Domäne. Somit wird durch die höhere Inhibitor-Aktivität in dieser Region die Aktivierung des Toll-Rezeptors verhindert und der Bereich mit hoher intranukleärer Dorsal-Konzentration auf die ventralsten Zellen begrenzt. Die endgültige Form des dynamischen Dorsal-Gradienten wird im Laufe der Embryonalentwicklung durch die gegensätzliche Wirkung der Spätzle-Produkte festgelegt.

In Embryonen von *grk*⁻-Weibchen erfolgt die Spätzle-Prozessierung über einen breiteren Bereich. Ab einer bestimmten Weite dieser Prozessierungs-Domäne kann der inhibitorische N-Terminus nicht mehr in ausreichendem Maße aus dieser heraus diffundieren und sammelt sich im ventralen Zentrum. Das Verhältnis von Inhibitor zu Aktivator führt jeweils zur Bildung eines Dorsal-Maximums an den Grenzen der expandierten Domäne und einem ventralen Dorsal-Minimum (Abbildung 1. 7).

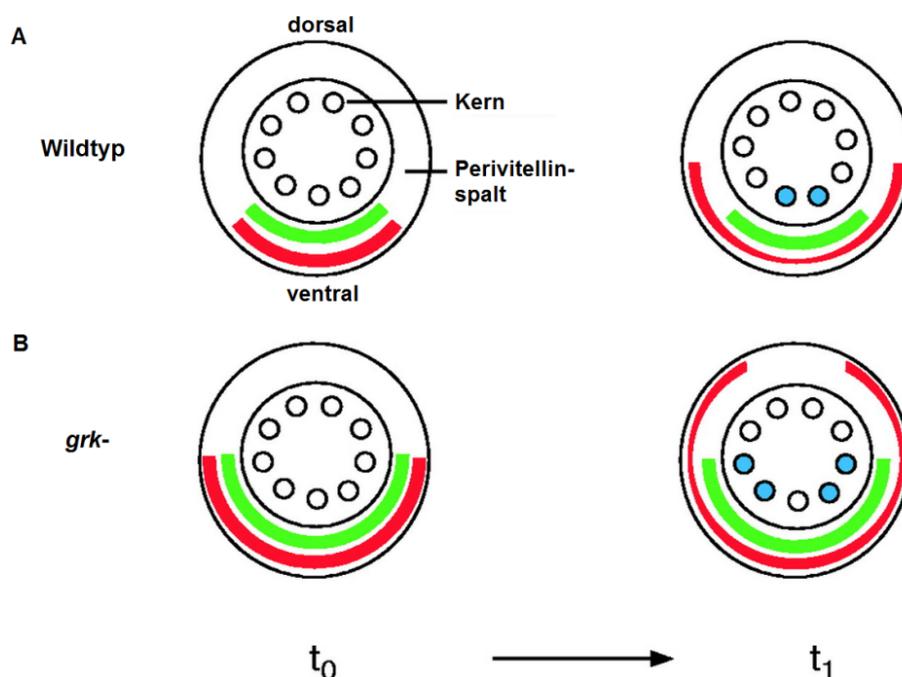


Abbildung 1. 7: Reaktions-Diffusions-Modell (A) Anfangs (t_0) sind die Produkte der Spätzle-Prozessierung im ventralen Bereich des Perivitellinspalts gleich verteilt. Mit der Zeit diffundiert das inhibitorische N-terminale Spätzle-Fragment (rot) schneller aus dem Zentrum, während das C-terminale Fragment C106 (grün) an den Toll-Rezeptor bindet und so ein Maximum von nukleären Dorsal (blau) auf der ventralen Seite des Embryos etabliert. (B) In *grk*⁻ Weibchen ist der Bereich der Spätzle-Prozessierung breiter als im Wildtyp. Das inhibitorische Fragment N-Spz kann nicht mehr schnell genug zu beiden Seiten aus dem ventralen Bereich hinaus diffundieren und akkumuliert daher auch im Zentrum. Die lateralen Regionen mit hohen nukleären Dorsal-Konzentrationen flankieren die ventrale Region hoher Inhibitor-Aktivität (Morisato 2001).

Die Annahme, dass Diffusion im Zuge eines auf lateraler Inhibition beruhenden Musterbildungsprozesses (Gierer and Meinhardt 1972) im Embryo und nicht im Follikelepithel an der Bildung des Dorsal-Gradienten beteiligt ist, wird durch mehrere Beobachtungen gestützt. Im ventralen Follikelepithel lokalisierte *pipe*-Klone bedingen nicht nur ein Ausbleiben der *twist*-Expression an der entsprechenden Position der anterior-posterioren Achse im Embryo, sondern auch der angrenzenden *sog*-Expression (Nilson and Schupbach 1998). Dies schließt das Vorhandensein eines Morphogen-Gradienten im Follikelepithel aus und deutet darauf hin, dass der Dorsal-Gradient auf der Diffusion einer Komponente eines embryonalen Signalwegs beruht. Hinweise, dass der Dorsal-Gradient zusätzlich durch einen diffusionsfähigen Inhibitor beeinflusst wird, geben die beobachteten Auswirkungen dorsaler Klone, die mutant für die EGFR-Signalwegkomponenten *Ras* oder *Raf* sind (James, Dorman et al. 2002; Peri, Technau et al. 2002). Pipe wird in den betroffenen Zellen aktiviert und sollte hier die ektopische Initiierung der proteolytischen Kaskade und die Bildung eines Dorsal-Gradienten ermöglichen. Überraschenderweise hatten dorsale Klone, die mindestens 70 Zellen umfassten jedoch nicht bis in ventrolaterale Regionen reichten, keine sichtbare Auswirkung auf die Musterbildung im Embryo, während ventrolaterale Klone, die an die endogene *pipe*-Expressionsdomäne angrenzten, zu Kutikula-Defekten und Ausweitung oder Aufspaltung der ventralen *twist*-Expression führten. Die Unfähigkeit dorsaler *Raf*-Klone den Toll-Signalweg zu initiieren und somit einen ektopischen Dorsal-Gradienten zu ermöglichen, kann einerseits durch die Aktivität eines bereits während der Oogenese in der dorsalen Region deponierten Inhibitors erklärt werden. Andererseits könnte ein Inhibitor (möglicherweise die N-terminale Spätzle-Domäne), der in der ventralen endogenen Pipe-Expressionsdomäne produziert wird und aus dieser nach dorsal diffundiert, die Initiierung ektopischer Musterbildungsprozesse unterdrücken (Morisato 2001; Peri, Technau et al. 2002). Zur Erklärung der beobachteten Achsenduplikation nach Überexpression von *spätzle* oder Ausweitung der *pipe*-Expression wird das Zugrundeliegen eines lateralen Inhibitionsprozesses favorisiert.

1.10 Fragestellung/Zielsetzung

Innerhalb des *pipe*-Promotors ist ein essentielles Repressorelement lokalisiert, das die Repression von *pipe* in dorsalen Follikelzellen vermittelt. Ziel der Arbeit ist die Identifizierung eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren, die durch die Bindung an diese Sequenz die dorsale Repression von *pipe* vermitteln. Zudem soll untersucht werden, ob dieses *cis*-regulatorische Element alleine ausreicht oder ob noch weitere Faktoren oder gar Mechanismen an der Regulation von *pipe* im Follikelepithel beteiligt sind.

Die vollständige Klärung der transkriptionellen Regulation von *pipe* böte die Möglichkeit durch gezielte Manipulation des endogenen Promotors eine uniforme *pipe*-Expression in der gesamten Eikammer zu erreichen. Hierdurch soll untersucht werden, ob überhaupt eine Asymmetrie benötigt wird, um die dorsoventrale Achse des späteren Embryos zu initiieren.

Mit Hilfe der uniformen *pipe*-Expression und mittels ektopischen, markierten *pipe*-Klonen soll außerdem geklärt werden, welche Prozesse der dorsoventralen Musterbildung zu Grunde liegen. Insbesondere soll analysiert werden, ob der Dorsal-Gradient möglicherweise durch laterale Inhibition auf Ebene des prozessierten Spätzle-Proteins etabliert und stabilisiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Reagenzien und Ausrüstung

Standardreagenzien und allgemeiner Laborbedarf wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Reagenzien/Chemikalien: Roth, Invitrogen, New England Biolabs, Roche, Sigma-Aldrich, BioBudget, Promega, Qiagen
- Verbrauchsmaterialien: Eppendorf, Roth, Sarstedt

2.1.2 *Drosophila melanogaster* Fliegenstämme

Abkürzungen:

BL: Bloomington Stock Center

SSR: Stammsammlung Siegfried Roth

VDRRC: Vienna Drosophila RNAi Center (Dietzl, Chen et al. 2007)

Genotyp	Quelle/Stamm-Nummer
<i>wt</i> (oregon R)	SSR
<i>w</i> [1118]	BL 6326
<i>ZH-attP-2A</i>	(Bischof, Maeda et al. 2007)
<i>w</i> ; <i>Gla/Cyo</i> ; <i>MKRS/TM2</i>	SSR
<i>UAS-GFP 60.5/TM3</i>	N. Perrimon
<i>w</i> ; <i>1500-us-pipe-LacZ/CyO</i> ; <i>MKRS/TM2</i>	M. Technau/SSR
<i>w</i> ; <i>1500-mutB-us-pip-LacZ/CyO</i> ; <i>MKRS/TM2</i>	M. Technau/SSR
<i>w</i> [1118]; <i>P{UAS-dicer2, w[+]}</i>	VDRRC 60009
<i>w</i> ; <i>UAS-Yan[act]/UAS-Yan[act]</i>	I.Rebay (Rebay and Rubin 1995)
<i>DI-Venus</i>	A. Stathopoulos (Reeves, Trisnadi et al. 2012)
Gal4-Treiberlinien:	
<i>w</i> ; <i>Cy2-Gal4</i>	T. Schüpbach
<i>w</i> ; <i>E4-Gal4</i>	T. Schüpbach
<i>w</i> ; <i>55B-Gal4</i>	N. Perrimon
<i>w</i> ; <i>GR1-Gal4</i>	BL 36287
<i>w</i> ; <i>Traffic jam-Gal4</i>	V. Riechmann
<i>actin>CD2>Gal4</i>	SSR

Fliegenstämmen zur klonalen Analyse:	
<i>w; UAS pip-ST2,pip[w/e]/TM3,Sb</i>	D. Stein
<i>w; UAS pip-ST2,rust,pip[684],eca/TM3,Sb</i>	D. Stein
<i>w; UAS pip-ST2,pip[C14]/TM3,Sb</i>	D. Stein
<i>w; rust pip[664]/TM3,Sb</i>	D. Stein
<i>w; UAS-VML-RFP14/CyO</i>	D. Stein (Zhang, Stevens et al. 2009)
<i>hs::FLP; SP; +/SM6-TM6</i>	BL
Im Rahmen diese Arbeit selbst generierte Fliegenstämmen:	
<i>w; E4 Ia/CyO</i>	selbst hergestellt
<i>w; B9 Ia/CyO</i>	selbst hergestellt
<i>w; B6 II</i>	selbst hergestellt
<i>1,6kbpip::eGFP-Pipe (on X)</i>	selbst hergestellt
<i>1,6kbΔBpipe::eGFP-Pipe (on X)</i>	selbst hergestellt
<i>1,6kbΔ69pipe::eGFP-Pipe (on X)</i>	selbst hergestellt
<i>1,6kbpip::eGFP-Pipe-ΔUTR (on X)</i>	selbst hergestellt
<i>1,6kbΔBpipe::eGFP-Pipe-ΔUTR (on X)</i>	selbst hergestellt
VDRC pUAST-RNAi-Stämme:	
<i>UAS-D-ets4/Ets98B-RNAi</i>	VDRC 107292
<i>UAS-D-elg/Ets97D-RNAi</i>	VDRC108936
<i>UAS-D-elg/Ets97D-RNAi</i>	VDRC 12633
<i>UAS-D-ets6/Ets21C-RNAi</i>	VDRC 106153
<i>UAS-D-ets6/Ets21C-RNAi</i>	VDRC 51225
<i>UAS-Ets96B-RNAi</i>	VDRC 30552
<i>UAS-Ets65A-RNAi</i>	VDRC 15354
<i>UAS-Ets65A-RNAi</i>	VDRC 15355
<i>UAS-eip74EF-RNAi</i>	VDRC 45900
<i>UAS-eip74EF-RNAi</i>	VDRC 105301
<i>UAS-pnt/D-ets2-RNAi</i>	VDRC 7171
<i>UAS-pnt/D-ets2-RNAi</i>	VDRC 105390
<i>UAS-EGFR-RNAi</i>	VDRC 43268
<i>UAS-Raf-RNAi</i>	VDRC 20909

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper

mouse anti-GFP (1:2000)	Invitrogen
rabbit anti-GFP (1:2000)	Cell Signaling Technologies
rabbit anti- β -Galactosidase (1:2000)	Promega
anti-Digoxigenin AP konjugiert (1:5000)	Roche
anti-Digoxigenin POD konjugiert (1:5000)	Roche
anti-Biotin AP konjugiert (1:5000)	Roche
mouse anti- β -Actin (1:1000)	Abcam
mouse anti-Golgi (1:2000)	Clontec

Sekundäre Antikörper

goat anti-mouse AlexaFluor488 (1:400)	Invitrogen
goat anti-rabbit AlexaFluor555 (1:400)	Invitrogen
goat anti-mouse HRP (1:5000)	Jackson Immunoresearch
goat anti-rabbit HRP (1:5000)	Jackson Immunoresearch

2.1.4 Oligonukleotide/PCR-Primer

Alle unten aufgeführten Oligonukleotid-Primer wurden von Sigma Aldrich oder Invitrogen bezogen.

Name	Sequenz 5'-3'
Pipe-Reportergen-Konstrukte	
Promotoren	
<i>EcoR1pipePromotor F</i>	CCG GAA TTC CAA CAT ATT GTG AGC GAC CAC
<i>BamH1pipePromotor R</i>	CGC GGA TCC CAA TGT CAA TTA CAC AAA AAA CAC AAT CGC TTG AG
<i>BamH1 Promotor F</i>	GGA TCC CAA CAT ATT GTG AGC GAC CAC AAT TG
<i>EcoR1 Promotor R</i>	GAA TTC CCA ATG TCA ATT ACA CAA AAA ACA CAA TC
<i>Actin5C Pr BamH1 F</i>	CCG GGA TCC ATC ATG AAT GGC ATC AAC TCT GAA TC
<i>Actin5C Pr EcoR1 R</i>	CCG GAA TTC GGT CTC TGG ATT AGA CGA CTG C
Promotor-Shift	
<i>Bam-ReprBS</i>	GAT CTC GTG TAA ATT TCT CGA TAA CAA TTG CAA AA
<i>Bam-ReprBS-rev</i>	GAT CTT TTG CAA TTG TTA TCG AGA AAT TTA CAC GA

<i>Eco-ReprBS</i>	AAT TTC GTG TAA ATT TCT CGA TAA CAA TTG CAA AA
<i>Eco-ReprBS-rev</i>	AAT TTT TTG CAA TTG TTA TCG AGA AAT TTA CAC GA
interne Deletionskonstrukte (Fusions-PCR)	
<i>DeltaB Fus F</i>	GAG GCT GGC GTT TTT CCA TTT ATT TTC AAC TTG TTG CTG
<i>DeltaB Fus R</i>	CAG CAA CAA GTT GAA AAT AAA TGG AAA AAC GCC AGC CTC
<i>Delta69 Fus F</i>	TTT TAT GTT TTG GCT GTT TTT ATG TTG AAA TAA AAA AAG TTT AAT AAG ACT AAA CAA TC
<i>Delta69 Fus R</i>	GAT TGT TTA GTC TTA TTA AAC TTT TTT TAT TTC AAC ATA AAA ACA GCC AAA ACA TAA AA
miRNA-UTR-Deletionskonstrukte (Fusions-PCR)	
<i>Fusionsprimer F</i>	AGTTAAACTTGTTCATATTTTTGATAACCGC
<i>Fusionsprimer R</i>	GCGGTTATCAAAAATATGACAAGTTTAACT
Reportergene (Fusions-PCR)	
<i>BamH1 EGFP pattB F</i>	CGC GGA TCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AGC
<i>EGFP-pipeFusionpr. F</i>	GCA TGG ACG AGC TGT ACA AGA TGT CTC TGA ACG CCG AGC G
<i>EGFP-pipeFusionpr. R</i>	CGC TCG GCG TTC AGA GAC ATC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
<i>Xba1FuspipeDUTR F</i>	TCT AGA TAC TCT TCA CAA ATC ACG AAC AAA TTG TAG G
<i>Xba1FuspipeDUTR R</i>	TCT AGA CAG TTC AAT TGC CAA TCA GGC CG
<i>Xho1 pipe UTR R</i>	CGC GTC GAG AGT TTT TTT TAG TTA TTT AAT GTT CTT TAT TTT TAT TTT TCG TTT CCA
IRES-Konstrukte (Fusions-PCR)	
<i>EcoR1 pipe ORF F</i>	GAA TTC ATG TCT CTG AAC GCC GAG CGA
<i>pipeIRES Fus F</i>	CCC GGC CTG ATT GGC AAT TGA ACT GCC CCC CCC CCT AAC GTT ACT GG
<i>pipeIRES Fus R</i>	CCA GTA ACG TTA GGG GGG GGG GCA GTT CAA TTG CCA ATC AGG CCG GG
<i>EGFPUTRFus F</i>	GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA ACT GTA CTC TTC ACA AAT CAC GAA CAA ATT GTA GG
<i>EGFPUTRFus R</i>	CCT ACA ATT TGT TCG TGA TTT GTG AAG AGT ACA GTT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CC
<i>Xba UTR R</i>	TCT AGA TTG AGT TTT TTT TAG TTA TTT AAT GTT CTT TAT TTT TAT
Zellkultur-Konstrukte	
Promotoren (Fusions-PCR)	
<i>BglIII Actin F</i>	AGA TCT CGC TGC CTG TTA TGT GG

<i>EcoR1 Actin R</i>	GAA TTC CAC CAC ACT GGA CTA GTA GG
<i>Insertionpr. B F</i>	CCA TGT GTG TGC AGC CAA CGC GTC GTG TAA ATT TCT CGA TAA CAA TTG CAA AA
<i>Insertionpr. B R</i>	CCA CTG TGT TGT TGC TTT TGT TGC TAT CGT TTT GCA ATT GTT ATC GAG AAA TTT ACA CGA
<i>Insertionpr. 2 F</i>	CCA TGT GTG TGC AGC CAA CGC GTT ATC GAG AAA TTT ACA CGA ATT TTC AAC TTG TTG C
<i>Insertionpr. 2 R</i>	CCA CTG TGT TGT TGC TTT TGT TGC TAT CGG CAA CAA GTT GAA AAT TCG TGT AAA TTT CTC GAT AA
Reportergene	
<i>pAc5.1EGFP EcoR1 F</i>	CCG GAA TTC AGT TAT GGT GAG CAA GGG CGA G
<i>pAc5.1EGFP Xho1 R</i>	CGC CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC
Primer zur Herstellung von Sonden für <i>in-situ</i>-Hybridisierung	
<i>3'T7 Universal-Primer</i>	AGG GAT CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCC CGG GGC
<i>5'T7 Universal-Primer</i>	GAG AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCC GCG G
<i>in situ eip74EF-RA F</i>	GGC CGC GGT CCG AGA GCA ACT TCG AGA T
<i>in situ eip74EF-RA R</i>	CCC GGG GCT GTA GAC CCT GCT GCT GTT G
<i>in situ ets21C-RA F</i>	GGC CGC GGC CAC CAG CAG CAG TAG CAT A
<i>in situ ets21C-RA R</i>	CCC GGG GCT GCA CCT TGG TCA TGA TGT T
<i>in situ ets65A F</i>	GGC CGC GGA GCA CTT CCA TCG CTA ACA
<i>in situ ets65A R</i>	CCC GGG GCC GCT GTG GTG ATA TGG TGT C
<i>in situ ets96B-RA F</i>	GGC CGC GGC GTA TAC TGC AGC GAC GTG T
<i>in situ ets96B-RA R</i>	CCC GGG GCT AGT AGC GCA AAC TGC GAG A
<i>in situ ets97D F</i>	GGC CGC GGA CAG CAG CAA TGA CTT GTC G
<i>in situ ets97D R</i>	CCC GGG GCA GTT CCT GGC CAT TCA TTT G
<i>in situ ets98B-RA F</i>	GGC CGC GGT GGC TCT GGA ATC CTT CAT C
<i>in situ ets98B-RA R</i>	CCC GGG GCG CTG TGA CCT CTC CGT CTT C
<i>in situ pnt-RB F</i>	GGC CGC GGC AGC AAA GCA ACA ACG AAA A
<i>in situ pnt-RB R</i>	CCC GGG GCG CCA CCT CAT CAG GAT CTG T
<i>in situ yan/aop-RA F</i>	GGC CGC GGC GAT CTC CCC AAA CTT GAC
<i>in situ yan/aop-RA R</i>	CCC GGG GCC TTC TGG GGC AAT TGT TGT T
<i>mir-8 in situ F</i>	GGC CGC GGC TGT GTG TGT GTG CAT CTC G
<i>mir-8 in situ R</i>	CCC GGG GCG GAC CGG GAA GGG TAA AAT A
<i>mir-11 in situ F</i>	GGC CGC GGG GCT GGC TGC ATA TGA TTT T
<i>mir-11 in situ R</i>	CCC GGG GCA TTT TGC ATC CGC CTG TAA C
<i>mir-33 in situ F</i>	GGC CGC GGC GCA CTG GAC AAA AGT CTC A

<i>mir-33 in situ R</i>	CCC GGG GCA CGA GTT CAA ATC GGT CTG G
<i>mir-283 in situ F</i>	GGC CGC GGC ACG TGT AGC TCC CCA AAA C
<i>mir-283 in situ R</i>	CCC GGG GCA CTT TCG GTT GCA ACA TTG ATG G
<i>mir-289 in situ F</i>	GGC CGC GGC TGT GGG CTG GTT CTC TGT T
<i>mir-289 in situ R</i>	CCC GGG GCT CCA TGC TGC CAT TAT CAA ATT GA
<i>mir-315 in situ F</i>	GGC CGC GGC CTG CGC AAC AAG GAA TAG T
<i>mir-315 in situ R</i>	CCC GGG GCG ATT CAA CTT GCT TAA CAA AGA TTC AG
<i>mir-cluster in situ R</i>	GGC CGC GGG TAT GTG TTA TTT AGT GGT GTT TCT
<i>mir-cluster in situ R</i>	CCC GGG CTT GAG AAC AAG TAA CGC GAG AA
<i>mir-ban in situ F</i>	GGC CGC GGT CTC GCC TCT TGT GGA TCT T
<i>mir-ban in situ R</i>	CCC GGG GCG CAG GCC TTC TCA TTG ACT C
Oligonukleotide für DNA-Affinitätschromatographie	
mut2XpipRP	[BtnTg] GAT GTG CCC GGG AGA TCG CCA CCG GTA CCC CGA TGT GCC CGG GAG ATC GCC ACC GGT ACC CC
mut2XpipRPrC	GGG GTA CCG GTG GCG ATC TCC CGG GCA CAT CGG GGT ACC GGT GGC GAT CTC CCG GGC ACA TC
2XpipRP	[BtnTg] TCG TGT AAA TTT CTC GAT AAC AAT TGC AAA ATC GTG TAA ATT TCT CGA TAA CAA TTG CAA AA
2XpipRPrC	TTT TGC AAT TGT TAT CGA GAA ATT TAC ACG ATC GTG TAA ATT TCT CGA TAA CAA TTG CAA AA

2.1.5 Plasmide

pAc5.1/V5-His A	Expressionsvektor für Zellkultur (Invitrogen)
pAc5.1:: <i>LacZ</i>	Expressionsvektor für Zellkultur mit β Gal-Reporter (Invitrogen)
pCR-TOPOII	Klonierungsvektor (Invitrogen)
pH-Stinger	eGFP-Reportervektor (Barolo, Carver et al. 2000)
C4PLZ	β Gal-Reportervektor zur Promotor-/Enhancer-Analyse (Barolo, Carver et al. 2000); GenBank Accession Number AF242365
1500- <i>mutB-us-pip</i> -C4PLZ	β Gal-Reportervektor mit <i>pipe</i> -Promotor und deletiertem CRM <i>Motiv B</i> (Martin Technau)
pCaSpeR4	Expressionsvektor (Thummel, Boulet et al. 1988) EMBL accession number X81645
pWPI	EMCV IRES-EGFP-Kassette (Didier Trono)
pattB	eukaryot. Expressionsvektor (Bischof, Maeda et al. 2007)
pipeST2-pBS-SK ⁺	<i>pipe</i> cDNA Isoform ST2 in pBluescript (Sen, Goltz et al. 1998)

2.1.6 Zellkultur-Materialien

<i>Drosophila</i> Schneider 2-Zellen (S2-DRSC)	(Schneider 1972)
Serumfreies Kulturmedium SFX-Insect	HyClone
FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Gibco

2.1.7 Software

Microsoft Office	Microsoft
Photoshop CS5	Adobe
ImageJ	Freeware (http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html)
Sequencher 4.9	GeneCode
pDRAW32	Freeware (http://www.acaclone.com/)
Oligo Calculator version 3.25	Freeware (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html)
Primer3	Freeware (http://frodo.wi.mit.edu)
Axio Vision 4.8.2	Carl Zeiss Vision GmbH
Sigma Plot 8.0	SPSS Inc.

2.1.8 Mikroskopie

Als Mikroskop für Durchlicht- sowie Fluoreszenz-Mikroskopie wurde das *Axioplan 2* von *Zeiss* benutzt, das mit einer *HBO 100W* UV-Lampe und einer *AxioCam color 412-312* Digital-Kamera, ausgestattet ist. Die Software *Axio Vision Version 2.0.5* (*Carl Zeiss Vision GmbH*) wurde auf einem Standard-PC verwendet. Für die Zellkultur-Dokumentation wurde zusätzlich das Fluoreszenz-Stereomikroskop *Lumar V12 Stereo* von *Zeiss* benutzt. Für die Dokumentation der Dorsal-Venus-Expression wurde ein *Axioplan Imager.Z2* mit *ApoTome.2* von *Zeiss*, das mit einer *HXP 120C* UV-Lampe und einer *AxioCam MRm* ausgestattet war, benutzt. Die Software *Axio Vision version 4.8.2* (*Carl Zeiss Vision GmbH*) wurde auf einem Standard-PC verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Fliegen

Die Fliegenhaltung erfolgte unter Standardbedingungen (Ashburner and Roote 2007; Ashburner and Roote 2007).

2.2.1.1 Keimbahn-Transformation

Transgene Fliegen wurden mittels DNA-Mikroinjektion in Blastoderm-Embryonen wie von Spradling und Rubin (Rubin and Spradling 1982) oder wie von Fish (Fish, Groth et al. 2007) beschrieben, erzeugt. Im Falle der P-Element-Transgenese wurden die Konstrukte jeweils in einer Konzentration von 0,6 mg/ml mit 0,1 mg/ml $\Delta 2$ -3 Helfer-DNA (Rubin, Hazelrigg et al. 1985; Laski, Rio et al. 1986) in Injektionspuffer (0,1 mM Phosphatpuffer [pH 7.4], 5 mM KCl) mit 2% Phenolrot injiziert. Im Falle der Sequenz-spezifischen Transgenese wurden die Konstrukte in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Injektionspuffer mit 2% Phenolrot injiziert. Die geschlüpften Fliegen wurden mit w^{1118} -Balancer-Stämmen verkreuzt. In der folgenden Generation wurden Fliegen mit orangen/rötlichen Augen positiv selektioniert und zur Etablierung homozygoter als auch balancierter Stämme verwendet.

2.2.1.2 Induktion von Keimbahnklonen

Geschlüpfte weibliche Fliegen mit den benötigten Genotypen (*hs::FLP/actin>CD2>Gal4; UAS-VML-RFP/Gla; UASpip^{ST2}pip^{C14}/UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴* oder *hs::FLP/actin>CD2>Gal4; UAS-VML-RFP/Gla; UASpip^{ST2}pip^{C14}/TM2*) wurden für drei Tage bei 25°C auf behefete Futterröhrchen gesetzt. Zur Kloninduktion wurden die Röhrchen für 2:30 min. in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Fliegen zur Eiablage in belüftete Plastikröhrchen auf behefete Apfelsaftagarplatten gesetzt. Nach 48, 72 und 96 Std. wurden die Eier mit einem Pinsel abgesammelt, mit 3S-Öl (*Voltales*) überschichtet und die Lage und Größe der induzierten Klone mit Hilfe eines fluoreszenten Stereomikroskops dokumentiert. Das 3S-Öl wurde danach mit Hilfe von Heptan abgespült, die Embryonen dechorionisiert, fixiert und für *in-situ*-Hybridisierungen verwendet.

Zum Nachweis, dass im Follikelepithel induzierte Klone durch Einbau des fluoreszenten Pipe-Substrats VML-RFP in der Eihülle repräsentiert werden, wurde die GFP-Expression in Ovarien von Fliegen des Genotyps *hs::FLP/actin>CD2>Gal4; UAS-VML-RFP14/UAS-GFP60.5* mittels Antikörperfärbung visualisiert.

2.2.1.3 Uniforme *pipe*-Expression

Um die Auswirkungen einer uniformen *pipe*-Expression auf die Musterbildung im Embryo zu untersuchen, wurde *pipe* mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems in einem *pipe*-negativen Hintergrund oder in einem wildtypischen Hintergrund in Ovarien überexprimiert. Fliegen mit dem Genotyp *Cy2-Gal4/CyO;UASpip^{ST2}pip^{C14}/UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴* bzw. *Traffic jam-Gal4/CyO;UASpip^{ST2}pip^{C14}/UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴* oder *Cy2-Gal4/CyO;UASpip^{ST2}pip^{w/e}/+* bzw. *Traffic jam-Gal4/CyO;UASpip^{ST2}pip^{w/e}/+* wurden für mindestens drei Tage bei 18 °C, 25°C oder 29°C gehalten. Zur Eiablage wurden sie bei der jeweiligen Temperatur in belüfteten Plastikröhrchen auf beheizte Apfelsaftagarplatten gesetzt. Nach vier Std. wurden die Embryonen abgesammelt und für eine spätere *in-situ*-Hybridisierung fixiert.

2.2.1.4 Fixierung von Embryonen

Die abgesammelten Embryonen wurden mit einem Pinsel von der Apfelsaftagarplatte abgesammelt und in ein Drahtkörnchen überführt. Nach Abwaschen der Hefe wurden die Embryonen mit 50%-igem NaOCl dechorionisiert, erneut mit Wasser gewaschen und dann in Fixierungslösung (5 ml 4%-iges Formaldehyd/PBS, 5 ml Heptan) überführt und leicht geschüttelt. Nach 20 min. wurde die untere Formaldehyd-haltige Phase abgenommen und durch das gleiche Volumen Methanol ersetzt. Durch starkes Schütteln wurden die Embryonen devitellinisiert. Die Embryonen wurden in Reagiergefäße überführt und in Methanol bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Anfertigung von Eihüllen- und embryonalen Kutikula-Präparaten

Fliegen des gewünschten Genotyps wurden zur Eiablage in belüfteten Plastikröhrchen auf beheizte Apfelsaftagarplatten gesetzt. Für Eihüllenpräparate wurden nach 24 Std. die Wildtyp-Eier, nach 48 Std. die Eier der Mutanten mit einem Pinsel abgesammelt, in einem Drahtkörnchen mit Wasser gewaschen und anschließend auf einem Objektträger mit Hoyer's-Medium und Milchsäure (1:1) eingebettet. Zur Herstellung der Kutikula-Präparate wurden die Embryonen vor dem Einbetten mit 50%-igen NaOCl dechorionisiert. Vor dem Fotografieren wurden die Präparate für mindestens 24 Std. bei 60°C geklärt.

2.2.1.6 Präparation und Fixierung von Ovarien

Fünf bis zehn frisch geschlüpfte Weibchen wurden drei bis vier Tage vor der Präparation der Ovarien in beheizte Futterröhrchen gesetzt. Die Präparation der Ovarien erfolgte unter einem

Stereobinokular in kalten PBT (PBS mit 0,1% Triton-X). Für die Antikörperfärbung wurden die Ovarien für 10 min. in 4%-igem Formaldehyd/PBT fixiert. Anschließend wurden sie für die Färbungen verwendet.

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden die Ovarien zunächst für 20 min. in 200 µl 4%-igem Formaldehyd/PBT (PBS mit 0,1% Tween), 20 µl DMSO und 600 µl Heptan fixiert. Die Heptan- sowie Formaldehyd-Phase wurden entnommen und die Ovarien nochmals für 5 min. in 500 µl frischem 4%-igem Formaldehyd/PBT fixiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,1%-igem PBT wurden die Ovarien direkt für die *in-situ*-Hybridisierung verwendet oder in 1 ml Methanol bei -20°C gelagert.

2.2.1.7 Antikörper-Färbung an Ovarien

Fixierte Ovarien wurden eine Stunde in 1%-igem BSA/PBT (PBS mit 0,1% Triton-X) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindestellen zu blockieren. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem/den primären Antikörper/n in PBT (PBS mit 0,3% Triton-X) bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Ovarien zuerst dreimal mit 0,1%-igem PBT gewaschen. Danach wurden unspezifische Bindestellen durch eine einstündige Inkubation in 10%-igem NGS/PBT blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem/den sekundären Antikörper/n für zwei bis drei Std. bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1%-igem PBT wurden die Ovarien für die anschließende Mikroskopie in *Vectashield* mit DAPI (*Linaris*) eingebettet.

2.2.1.8 Herstellung von Sonden für *in-situ*-Hybridisierung

Primerdesign:

Für das Primer-Design wurde die Online-Version des Programms Primer3 verwendet. Die Sequenz der pri-miRNA wurde als Template benutzt. Folgende Parameter wurden verwendet: Produktgröße 700-800 bp, maximale Primerlänge 20-22 bp. Im Falle des Forward-Primer wurde die Sequenz GGCCGCGG an das 5'-Ende angehängt, während an das 5'-Ende des Reverse-Primers die Sequenz CCCGGGGC angehängt wurde.

PCR:

In einer ersten PCR wurde mit dem Reaktionsmix *Red Taq* (*Sigma*) und beiden Primern aus genomischer DNA oder cDNA die Sequenz der pri-miRNA amplifiziert (Annealing-Temperatur 57°C, 35 Zyklen á 1 min.). Zur Herstellung eines *Templates* für eine markierte

antisense-Sonde wurde der genspezifische *Forward*-Primer sowie der *3'T7 Universal-Primer* verwendet. Das *Template* für die *sense*-Sonde wurde mit dem genspezifischen *Reverse*-Primer und dem *5'T7 Universal-Primer* amplifiziert. Für die zweite PCR wurden die gleichen Parameter wie bei der ersten PCR verwendet.

Herstellung von Digoxigenin/Biotin-markierten Sonden:

Für die Markier-Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert: 8 µl RNAse-freies H₂O, 2 µl *Dig-* oder *Biotin-labeling mix (Roche)*, 2 µl Transkriptionspuffer sowie 2 µl *T7 RNA-Polymerase (Ambion T7 Maxiscript Kit)*, 6 µl PCR-Produkt. Das Reagiergefäß wurde für zwei bis vier Std. bei 37°C inkubiert. Die Transkription wurde durch das Zufügen von 30 µl H₂O, 50 µl 2x Stop-Lösung (0,2 M NaAc, 1% HAc, pH 6,0), 5 µl tRNA sowie 10 µl 5 M LiCl gestoppt. Nach dem Zufügen von 300 µl 100% Ethanol wurde die RNA für 30 min. bei -20°C gefällt und anschließend bei 4°C für 15 min. mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 300 µl 70%-iges Ethanol zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min. wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 100 µl Hybridisierungslösung (HL: 50% Formamid; 5xSSC; 50 µl/ml Heparin; 0,2% Tween) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.1.9 *in-situ*-Hybridisierung

Alle nicht fluoreszenten *in-situ*-Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durchgeführt. Die Ovarien oder Embryonen wurden in 1:1 MeOH/PBT (0,2% Tween) rehydriert. Nach mehrfachem Waschen mit 0,2%-igen PBT wurden die Ovarien oder Embryonen erneut für 20 min. mit 4%-igen Formaldehyd/PBT fixiert. Embryonen wurden nach erneutem Waschen mit PBT für 5 min., Ovarien für 10 min. mit 50 µg/ml Proteinase K in PBT verdaut. Der Proteinase K-Verdau wurde durch eine 2-minütige Inkubation mit 2 mg/µl Glycin in PBT abgestoppt. Anschließend wurden die Ovarien/Embryonen für einige Male mit PBT gewaschen und erneut für 20 min. mit 4%-igen Formaldehyd refixiert. Nachdem drei Waschschritte mit PBT erfolgt waren, wurden die Ovarien oder Embryonen zuerst 10 min. in 1:1 Hybridisierungslösung/PBT und anschließend weitere 10 min. in 100%-iger Hybridisierungslösung (HL: 50% Formamid; 5xSSC; 50µg/ml Heparin; 0,2% Tween) inkubiert. Es folgte eine Prähybridisierung bei 55°C in HL mit 100 µg/ml ssDNA. Die Inkubation mit der RNA-Sonde erfolgte über Nacht bei 55°C in HL. Am folgenden Tag wurden die Ovarien/Embryonen bei 55°C erst drei Mal kurz mit warmer HL gewaschen, danach vier Mal für 30 min. mit HL inkubiert. Darauf folgten jeweils 10-minütige

Waschschritte mit 4:1, 3:2 und 2:3 (v/v) HL/PBT bei 55°C. Der letzte Waschschritt mit 1:4 (v/v) HL/PBT erfolgte bei Raumtemperatur. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurden die Ovarien oder Embryonen zweimal 20 min. mit 1%-igen BSA/PBT inkubiert. Die Inkubation mit dem AP-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Ovarien oder Embryonen drei Mal kurz und darauf dreimal für 15 min. mit PBT gewaschen. Danach wurden sie dreimal für 5 min. in AP-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris [pH 9,5], 0,2% Tween) inkubiert. Für die Färbung wurden die Ovarien und Embryonen in Glasschälchen überführt und so lange mit 500 µl Färbelösung (500 µl AP-Puffer + 20 µl *NBT/BCIP Stock Solution (Roche)*) inkubiert bis eine Farbreaktion zu erkennen war. Diese wurde durch mehrfaches Waschen mit PBT abgestoppt. Die Präparate wurden dann 10 min. in 50%-igem Glycerin inkubiert und zuletzt in 100% Glycerin auf Objektträgern mit Glasspacern eingebettet.

Zum Nachweis von miRNAs wurde nach dem oben aufgeführten Protokoll vorgegangen. Der Verdau mit Proteinase K und die anschließende Glycin-Inkubation wurde durch eine halbstündige Inkubation mit 0,5%-igen SDS ersetzt. Die Prähybridisierung erfolgte für sechs bis acht Stunden während die Inkubation mit der RNA-Sonde für mindestens 24 Std. erfolgte (Aboobaker, Tomancak et al. 2005).

2.2.1.10 Fluoreszente *in-situ*-Hybridisierung

Die Embryonen wurden in 1:1 (v/v) MeOH/PBT (PBS mit 0,1% Tween) rehydriert. Nach mehrfachem Waschen mit PBT wurden die Embryonen für 5 min. mit 5 µg/ml Proteinase K in PBT verdaut. Anschließend wurden die Embryonen für einige Male mit PBT gewaschen und dann für 25 min. mit 5%-igem Formaldehyd refixiert.

Nachdem drei Waschschritte mit PBT erfolgt waren, wurden die Embryonen zuerst 5 min. in 1:1 (v/v) Hybridisierungslösung/PBT inkubiert. Darauf erfolgte die Prähybridisierung bei 55°C in Hybridisierungslösung (HL: 50% Formamid; 5xSSC; 2% SDS, 2% Blocking reagent BBR (Roche), 50 µg/ml Heparin, 250 µg/ml tRNA). Die Inkubation mit den DNA-Sonden erfolgte über Nacht bei 55°C in HL.

Am folgenden Tag wurden die Embryonen bei 55°C dreimal für 25 min. in Hyb-Wash (50% Formamid; 2xSSC; 1% SDS, 0,1% Tween) und anschließend bei RT für 5 min. in 1:1 (v/v) Hyb-Wash/MABT sowie viermal 10 min. in MABT inkubiert (MABT: 1xMAB (5xMAB: 58 g Maleinsäure, etwa 32 g NaOH-Pellets, 43,8 g NaCl [pH 7.5]), 0,1% Tween).

Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurden die Embryonen für eine Stunde in 2% BBR/10% NGS/MABT inkubiert. Die Inkubation mit dem AP-konjugierten anti-Biotin-Antikörper sowie dem POD-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörper erfolgte über Nacht bei

4°C. Am folgenden Tag wurden die Embryonen viermal für 15 min. mit MABT gewaschen. Danach wurden sie zweimal für 5 min. in AP-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris [pH 9,5], 0,1% Tween) inkubiert. Für die Detektion der Biotin-markierten Sonden wurde eine Fast Red Tablet (Roche) in 2 ml AP-Puffer gelöst und diese Lösung durch eine Nylon-Membran (0,2 µm) filtriert. Je benötigtem ml Fast Red-Färbelösung wurden 10 µl HNPP-Lösung (Roche) hinzugegeben. Die Embryonen wurden in Glasschälchen überführt und so lange mit der Färbelösung inkubiert bis eine Farbreaktion zu erkennen war. Diese wurde durch mehrfaches Waschen mit PBT abgestoppt.

Die darauf folgende Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde erfolgte mit dem *TSA detection kit with alexa488 tyramide (Molekular Probes)*. Dazu wurden die Embryonen in *Amplification Buffer* mit 0,003% H₂O₂ überführt und nach Zugabe von 1 µl Tyramide-Lösung für zwei Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch mehrfaches Waschen mit PBT abgestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit PBT wurden die Embryonen für die anschließende Mikroskopie in *Vectashield* mit DAPI (*Linaris*) eingebettet.

2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.2.1 Klonierung der *pipe-LacZ* Reporterkonstrukte

Die *pipe-LacZ*-Konstrukte, bei denen das *Motiv B* aus seiner ursprünglichen Position deletiert und an den Positionen -1 sowie -1500 bp relativ zum Transkriptionsstart wieder integriert wurde, wurden wie folgt erzeugt. Jeweils 1 µg der 5'-phosphorylierten Oligonukleotide *Bam-ReprBS* und *Bam-ReprBS-rev* oder *Eco-ReprBS* und *Eco-ReprBS-rev* wurden in Renaturierungspuffer (10 mM Tris/HCl [pH 8,1], 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) für 3 min. auf 95°C erhitzt und dann langsam abgekühlt. Mit Hilfe der BamH1-Überhänge wurde das doppelsträngige *Motiv B* dann 1500 bp oberhalb des *LacZ*-Transkriptionsstarts in das mit BamH1 verdaute Plasmid *1500-mutB-us-pip-C4PLZ* ligiert. Die durch einen EcoR1-Restriktionsverdau erzeugten EcoR1-Überhänge ermöglichten die Ligation des *Motiv B* in den EcoR1-verdauten Vektor direkt vor den Transkriptionsstart des *LacZ*-Reportergens.

2.2.2.2 Klonierung der GFP-Fusionskonstrukte

Klonierung des EGFP-Pipe-Fusionsproteins:

Zur Herstellung eines EGFP-Pipe-Fusionsproteins wurde die Fusions-PCR genutzt (Shevchuk, Bryksin et al. 2004). Zuerst wurden in separaten PCRs der ORF von *eGFP* mit Hilfe der Primer *BamH1 EGFP pattB F* und *EGFP-pipeFusionpr. R* aus pHStinger sowie der

pipe ORF samt 3'-UTR mit Hilfe der Primer *Xho1 pipe UTR R* und *EGFP-pipeFusionpr. R* aus *pipeST2-pBS-SK⁺* mit dem *Expand High Fidelity PCR System (Roche)* amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Hiss)* aufgereinigt.

In einer zweiten PCR wurden jeweils 100 ng der gereinigten PCR-Produkte mit den Primern *EcoR1 pipe ORF F* und *Xho1 pipe UTR R* eingesetzt. Für die fünf Fusionschritte, in welchen sich die komplementären Überhänge der Fusionsprimer zusammenlagern, wurden folgende Parameter gewählt: Erhitzen auf 94°C für 1 min., 5 Zyklen mit 30 sek. bei 94°C, 1 min. bei 55°C und 2 min. bei 72°C. Direkt im Anschluss erfolgte eine Standard-PCR nach Angaben des *Expand High Fidelity PCR System*, um das entstandene Fusionsprodukt für die nachfolgende TOPO-Klonierung zu amplifizieren. Die Klonierung des Fusions-PCR-Produktes in den pCR-TOPOII-Vektor erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Fusionsprotein wurde mittels eines *EcoR1/Xho1*-Doppelverdau aus dem pCR-TOPOII-Vektor herausgeschnitten und in den simultan verdauten pCaSpeR4 ligiert.

Deletion potentieller miRNA-Bindestellen aus der *pipe* 3'-UTR:

Die Deletion der miRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR von *pipe* erfolgte mit Hilfe einer Fusions-PCR (s.o., (Shevchuk, Bryksin et al. 2004)). In zwei separaten PCRs wurden mit den Primern *Xba1FuspipeDUTR F* und *Fusionprimer R* sowie *Xho1 UTR R* und *Fusionprimer F* die Bindestellen flankierende Bereiche amplifiziert. In einer zweiten PCR wurden die aufgereinigten PCR-Produkte fusioniert. Folgende Parameter wurden gewählt: Erhitzen auf 94°C für 1 min., 5 Zyklen mit 30 sek. bei 94°C, 1 min. bei 55°C und 1 min. bei 72°C. Direkt im Anschluss erfolgte eine Standard-PCR. Die verkürzte 3'-UTR wurde dann in pCR-TOPOII ligiert. Durch einen Doppelverdau mit *Xba1* und *Xho1* wurde die 3'-UTR ausgeschnitten und in den simultan verdauten pCaSpeR4 ligiert. Das EGFP-Pipe Fusionsprotein wurde in diesem Falle mit den Primern *BamH1 EGFP pattB F* und *Xba1FuspipeDUTR R* amplifiziert und in den *BamH1/Xba1* verdauten 3'-UTR-pCaSpeR4 ligiert.

Klonierung der internen Promotor-Deletionen:

Die Region 1,5 kb oberhalb des Transkriptionsstarts und die 5'-UTR von *pipe* wurden mit den Primern *EcoR1pipePromotor F* sowie *BamH1pipePromotor R* mit Hilfe des *Expand High Fidelity PCR System* aus genomischer DNA amplifiziert und in den pCR-TOPOII-Vektor ligiert.

Die interne Deletion des *Motiv B* und des *Motiv 69* erfolgte mit Hilfe einer Fusions-PCR (s.o., (Shevchuk, Bryksin et al. 2004). Als Fusionsprimer dienten *DeltaB Fus F* und *DeltaB Fus R* sowie *Delta69 Fus F* und *Delta69 Fus R*, deren Überhänge aus den die Motive flankierenden Sequenzen bestanden. In der zweiten PCR wurden jeweils 100 ng der aufgereinigten PCR-Produkte (s.o.) mit den Primern *EcoR1pipePromotorF* und *BamH1pipePromotor R* eingesetzt. Für die fünf Fusionschritte wurden folgende Parameter gewählt: Erhitzen auf 94°C für 1 min., 5 Zyklen mit 30 sek. bei 94°C, 1 min. bei 55°C und 1 min. bei 72°C. Direkt im Anschluss erfolgte eine Standard-PCR. Die Klonierung des Fusions-PCR-Produktes in den pCR-TOPOII-Vektor erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Promotoren wurden mittels eines BamH1/EcoR1-Doppelverdau aus dem pCR-TOPOII-Vektor herausgeschnitten und in den simultan verdauten *eGFP-pipe-pCaSpeR4* oder *eGFP-pipe-ΔUTR-pCaSpeR4* ligiert. Zuletzt wurde das eGFP-pipe-Fusionskonstrukt samt jeweiligem Promotor mit Hilfe von EcoR1 und Xho1 aus pCaSpeR4 herausgeschnitten und in pattB ligiert.

2.2.2.3 Klonierung des Pipe-IRES-GFP-Konstrukts

Die *IRES-eGFP*-Kassette wurde mit den Primern *pipeIRES Fus F* und *EGFPUTRFus R* aus pWPI amplifiziert. Die 3'-UTR von *pipe* wurde mit den Primern *EGFPUTRFus F* und *Xba UTR R* aus *pipeST2-pBS-SK⁺* amplifiziert, der ORF von *pipe* mit den Primern *EcoR1 pipe ORF F* und *pipeIRES Fus R*. In allen Fällen wurde das *Expand High Fidelity PCR System* verwendet. Die Fusions-PCR (Shevchuk, Bryksin et al. 2004) wurde genutzt, um den ORF sowie die 3'-UTR von *pipe* mit der *IRES-eGFP*-Kassette zu fusionieren. Von den zuvor amplifizierten PCR-Fragmenten wurden jeweils 100 ng des aufgereinigten Produkts in einer zweiten PCR mit den Primern *EcoR1 pipe ORF F* und *Xba UTR R* eingesetzt. Für die fünf Fusionschritte wurden folgende Parameter gewählt: Erhitzen auf 94°C für 1 min., 5 Zyklen mit 30 sek. bei 94°C, 1 min. bei 55°C und 2 min. bei 72°C. Direkt im Anschluss erfolgte eine Standard-PCR. Das Fusions-Produkt wurde zuerst in pCR-TOPOII ligiert. Danach wurde es durch einen Doppelverdau mit EcoR1 und Xba1 wieder herausgeschnitten und in den simultan verdauten pattB ligiert.

2.2.2.4 Klonierung der Promotorkonstrukte für Zellkultur

Klonierung des GFP-Reporter in pAc5.1/A:

Der ORF von *eGFP* wurde mit den Primern *pAc5.1EGFP EcoR1 F* und *pAc5.1EGFP Xho1 R* mit Hilfe des *Expand High Fidelity PCR System* aus pH-Stinger amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in den pCR-TOPOII ligiert. Durch einen Doppelverdau mit

EcoR1 und Xho1 wurde der *eGFP*-ORF wieder ausgeschnitten und in den simultan verdauten pAc5.1 ligiert.

Die Fusions-PCR (Shevchuk, Bryksin et al. 2004) wurde genutzt, um die Repressor-elemente, zum einem das *Motiv 2* und zum anderen das *Motiv B* in den *Actin5C*-Promotor zu integrieren. In einer ersten PCR wurde mit dem *BglII* *Actin F* und dem *Insertionpr. 2/B R* das distale Fragment sowie mit *EcoR1 Actin R* und *Insertionpr. 2/B F* das proximale Fragment aus dem Vektor pAc5.1/V5-His A mit dem *Expand High Fidelity PCR System* amplifiziert. In der zweiten PCR wurden jeweils 100 ng der aufgereinigten PCR-Produkte (s.o.) mit den Primern *BglII* *Actin F* und *EcoR1 Actin R* eingesetzt. Für die fünf Fusionschritte wurden folgende Parameter gewählt: Erhitzen auf 94°C für 1 min., 5 Zyklen mit 30 sek. bei 94°C, 1 min. bei 55°C und 1 min. bei 72°C. Direkt im Anschluss erfolgte eine Standard-PCR. Die Fusions-Produkte wurden zuerst in pCR-TOPOII ligiert. Danach wurden sie durch einen Doppelverdau mit *BglII* und *EcoR1* wieder herausgeschnitten und in den simultan verdauten pAc5.1::eGFP ligiert.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Revitalisierung der S2-Zellen

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank (Kojair 2009) durchgeführt.

Nach der Entnahme eines Cryo-Konservierungsröhrchens mit S2-Zellen aus dem Gefrierschrank, wurde vorgewärmtes Nährmedium (SFX/10% FBS) tropfenweise auf die Zellen gegeben, um diese zügig aufzutauen. Die Zellsuspension wurde daraufhin in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt, in welche bereits 5 ml Nährmedium vorgelegt worden waren. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurde der Mediumüberstand abgesaugt und durch 5 ml frisches Nährmedium ersetzt, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

2.2.3.2 Kulturbedingungen

Die S2-Zellen wurden in FBS-haltigem Nährmedium (SFX/10% FBS) bei 25°C in 25 cm²-Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Abhängig von der Zelldichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage mit frischem Nährmedium versorgt oder subkultiviert.

2.2.3.3 Subkultivierung

48 Stunden nach Aussaat der Zellen erfolgte die Überprüfung der Zellkonfluenz. Passagen, die das Kriterium erfüllten, wurden für folgend beschriebene Subkultivierung verwendet.

Die adhärennten Zellen wurden durch Klopfen von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und ausgiebig durch mehrmaliges Aufziehen mit einer sterilen Glaspipette resuspendiert. Von diesem Zellsuspensat wurde jeweils 1 ml in eine neue Kulturflasche, in die 5 ml frisches Nährmedium vorgelegt worden waren, überführt. Erfolgte nach 48 Stunden keine Subkultivierung, da die erwünschte Zelldichte noch nicht erreicht war, wurde lediglich das vorhandene Medium abgesaugt und für 24 Stunden neues Kulturmedium hinzugegeben.

2.2.3.4 Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Von der Zellsuspension wurden 20 µl mit 80 µl einer 0,125%-igen Trypanblaulösung gemischt. 20 µl dieses Ansatzes wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die S2-Zellen unter dem *Axioplan 2*-Mikroskop von *Zeiss* gezählt. Abgestorbene Zellen nehmen auf Grund der zerstörten Plasmamembran den Farbstoff Trypanblau auf und sind so gut von lebenden, nicht gefärbten Zellen zu unterscheiden. Nach dem Auszählen von 4 x 16 Quadraten konnte mit folgender Formel die Zellzahl/ml berechnet werden:

$$\text{Zellen / ml} = \left[\frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \right] * \text{Verdünnung sfaktor} * \text{Kammerfakt or}$$

2.2.3.5 Subkultivierung für transiente Kotransfektion

Die zu 70-80% konfluenten Zellen einer 25 cm²-Kulturflaschen wurden abgeklopft, resuspendiert und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach dem pelletieren der Zellen für 5 min. bei 1000 g in einer Schwenkrotorzentrifuge *Multifuge 3SR+* (*Thermo Scientific*) wurde das alte Nährmedium abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, sodass 3x10⁵ lebende Zellen/ml vorlagen. In jede Vertiefung einer 24 well-Platte wurde 1 ml Zellsuspensat gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 Std. bei 25°C, so dass ein konfluentes Wachstum erreicht wurde. Am Tag der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt und 0,5 ml frisches Medium hinzugegeben.

2.2.3.6 Transiente Kotransfektion

Die Reportergen-Konstrukte (pAc5.1::eGFP mit normalem *Actin5C*-Promotor oder pAc5.1/*MotB/2*::eGFP mit integrierten Repressorelementen) wurden mittels des *TransFectin™ Lipid Reagent* (*BioRad*) in S2-Zellen eingebracht. Dabei diente der

kotransfizierte Vektor pAc5.1::*LacZ* zum Vergleich der Transfektionseffizienz der unterschiedlichen Ansätze.

Für die Transfektion wurden pro Reaktionsansatz 2 µl Transfektionsreagenz in 50 µl serumfreiem SFX-Medium verdünnt. Anschließend wurden jeweils 0,5 µg des Normalisierungsvektors pAc5.1::*LacZ* und 0,5 µg des Reportervektors pAc5.1::*eGFP* in 50 µl serumfreien SFX verdünnt. Nach Zugabe der verdünnten DNA zum Transfektionsreagenz wurden die Ansätze 30 min. inkubiert.

Der DNA-Reagenz-Komplex wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48 Std. erfolgte eine Antikörper-Färbung gegen βGal und EGFP um den möglichen Einfluss der Repressorelemente im *Actin5C*-Promotor auf die Reporter-Expression zu visualisieren.

2.2.3.7 Antikörperfärbung an S2-Zellen

48 h nach der transienten Transfektion wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBT gewaschen und 10 min. mit 4%-igen Formaldehyd fixiert. Nach Abnahme der Fixierungslösung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBT gespült und dann 1 Std. in 1%-igen BSA/PBT auf einem Rüttler inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Nach Abnahme der BSA-Lösung wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem primären mouse anti-GFP und rabbit anti-βGal Antikörper (Endverdünnung 1:1000) inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der primäre Antikörper abgenommen, die Zellen dreimal mit PBT gewaschen und 1 Std. mit 10% NGS/PBT inkubiert. Nach Abnahme der NGS-Lösung wurden die sekundären Antikörper goat anti-mouse AlexaFluor488 und goat anti-rabbit AlexaFluor555 (Endverdünnung 1:400) für 2 Std. hinzugegeben. Die Antikörperlösung wurde danach abgenommen, die Zellen dreimal mit PBT gewaschen und für die anschließende Mikroskopie in *Vectashield* mit DAPI (Linaris) eingebettet.

2.2.3.8 Statistische Auswertung

Alle Transfektionen wurden viermal durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels eines ungepaarten, zweiseitigen *t*-Tests. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinextraktion aus S2-Zellen

48 h nach erfolgter Kotransfektion wurden alle S2-Zellen aus den jeweiligen Kulturschalen entnommen und bei 1000 g in einer Schwenkrotorzentrifuge *Multifuge 3SR+* für 5 min. pelletiert. Nach Abnahme des Mediumüberstandes wurde das Zellpellet in 20 µl Lysepuffer (0,15 M NaCl, 5 mM EDTA [pH 8,0], 10 mM Tris-Cl [pH 7,4], 1% Triton, 1:1000 5 M DTT, 1:1000 100 mM PMSF in Isopropanol) gelöst und für 10 min. auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, welcher die Proteine enthielt, in ein neues Reagiergefäß überführt und für die anschließende Protein-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.4.2 Proteinextraktion aus Ovarien

Die Ovarien wurden in eiskaltem PBT präpariert und dann in 20 µl 2xSDS-Probenpuffer (120 mM Tris [pH 6,8], 0,2 M DTT, 12,8% Glycerol, 4% SDS, 0,1% Bromphenolblau) aufgenommen. Nach der Homogenisierung mit einem Plastikpestill wurden die Proben mit 14.000 rpm für 15 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin 3 min. lang auf 95°C erhitzt und nach dem Abkühlen umgehend für die anschließende Protein-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.4.3 DNA-Affinitätschromatographie

Für die Isolierung des Repressors, der an das *Motiv B* im *pipe*-Promotor binden kann, wurde das μ MACSTM *FactorFinder Kit* (Miltenyi Biotec) verwendet.

Präparation der Zelllysate:

Die Präparation der Zelllysate erfolgte auf Eis. Hierzu wurden 1 g Embryonen in 15 ml PBT mit Protease-/Phosphatase-Inhibitoren und PMSF (150 µl 0,1 M PMSF, 75 µl PIC, 75 µl 0,2 M aktiviertes Natriumorthovanadat, 5 µl 0,2 M Phenylarsinoxid in PBS/0,1% Triton -X) gewaschen und dann in einem Glaszylinder mit Pestill homogenisiert. Dann wurde das Lysat für 1 min. bei 4°C mit 400 g zentrifugiert, um Vitellinmembranen und andere feste Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches Reagiergefäß überführt und erneut mit 1.100 g bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 20 ml eiskaltem Zelllyse-Puffer (1,7 ml 1 M KCl, 1 ml 0,1 M HEPES, 100 µl 100% IGEPAL, 100 µl 0,2 M aktiviertes Natriumorthovanadat, 5 µl 0,2 M Phenylarsinoxid, 150 µl 0,1M PMSF, 75 µl PIC in

destilliertem Wasser, pH 8,0) resuspendiert. Die Lyse erfolgte dann durch drei Einfrier- und Auftau-Zyklen: Die Zellen wurden erst für 2 min. bei 37°C, dann für 5 min. bei -70°C inkubiert. Die Lysate wurden zuletzt für 5 min. mit 15.000 g bei 4°C zentrifugiert und der geklärte Überstand für die DNA-Affinitätschromatographie verwendet.

Herstellung der „capture“-DNA:

Die Herstellung der „capture“-DNA, bestehend aus der Sequenz von *Motiv B* sowie einer negativen Kontrolle, erfolgt genau nach Angaben des Herstellers mit den Biotin-gekoppelten Oligonukleotiden 2XpipRP und 2XpipRPrC sowie mut2XpipRP und mut2XpipRPrC.

Magnetische Isolierung des Transkriptionsfaktors:

Die Isolierung des TF erfolgte nach Angaben des Herstellers. Pro 100 µl Bindepuffer wurden 8 µl Binding Enhancer, 40 µl Poly[dl:dC], 2 µl 0.2 M Phenylarsinoxid und 2 µl 0.2 M aktiviertes Natriumorthovanadat zugefügt. Alle Waschfraktionen wurden aufgefangen und die darin eluierten Proteine dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.2.4.4 SDS-PAGE

Die Proteinextrakte der kotransfizierten S2-Zellen oder der Ovarien wurden über 12%-ige SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Diese Gele bestanden aus einem Trenngel (3 ml 60% Mix, 2 ml 30%-iges Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 10 µl 40%-iges Ammoniumpersulfat (APS), 10 µl TEMED) und einem vorgeschaltetem Sammelgel (1,8 ml 90% Mix, 0,2 ml 30%-iges Polyacrylamid/ Bisacrylamid (30:1), 10 µl 40%-igem APS, 10 µl TEMED).

10 µl der Proteinextrakte wurden mit dem gleichen Volumen des 2xSDS-Probenpuffers (120 mM Tris [pH 6,8], 0,2 M DTT, 12,8% Glycerol, 4% SDS, 0,1% Bromphenolblau) gemischt und für 3 min. auf 95°C erhitzt. Der gesamte Extrakt wurde dann in die Taschen des Sammelgels gegeben. Als Größenstandard diente der *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für 90 min bei 200 V in 1 l Laufpuffer (3 g Tris, 1 g SDS, 14,4 g Glycin).

60% Mix: 200 ml lower Tris, 160 ml Glycerin, 120 ml H₂O

90% Mix: 31 ml upper Tris, 80 ml H₂O

Lower Tris: 18,2 g Tris, 4 ml 10% SDS add H₂O to 100 ml, add HCl to pH 8,8

Upper Tris: 6,1 g Tris, 3 ml 10% SDS add H₂O to 100 ml, add HCl to pH 6,7

2.2.4.5 Western-Blot und Protein-Detektion

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens in einem vertikalen Puffertank auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 Std. bei 4°C mit 100 V in 1 l Transferpuffer (5,8 g Tris, 2,92 g Glycin, 0,375 g SDS, 200 ml Methanol). Nach dem Blotting wurde die Membran für eine Stunde in Blockpuffer (10 mM Tris [pH 7,5], 150 mM NaCl, 3% Milchpulver, 0,1% Tween) inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper mouse anti- β -Actin inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min. mit Blockpuffer gewaschen, bevor diese dann für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper anti-mouse HRP inkubiert wurde.

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das *ECL Western Blotting Substrate* (Pierce) eingesetzt. Die Chemilumineszenz wurde durch die Exposition eines Autoradiographiefilms (Kodak) nachgewiesen. Die Expositionszeit lag bei 5 Minuten.

Nach der Detektion von β -Actin wurde die Membran für 30 min. bei 55°C in Strip-Lösung (16,5 ml 1 M Tris [pH 6,8], 50 ml 10% SDS, 1,8 ml β -Mercaptoethanol) inkubiert, um die Antikörper abzulösen. Anschließend erfolgte die Detektion von GFP und *LacZ* mittels der Primärantikörper rabbit anti-GFP und rabbit anti- β Gal sowie dem Sekundärantikörper anti-rabbit HRP.

Der unspezifische Nachweis des gesamten Proteinmusters auf der Nitrocellulosemembran erfolgte mit dem *ProteoSilver*TM Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich).

2.2.5 Analyse der *cis*-regulatorischen Region von *pipe*

Durch die Analyse der hoch konservierten *cis*-regulatorischen Sequenz zwischen -1135 und -985 bp im *pipe*-Promotor von *Drosophila melanogaster* sollten potentielle Sequenzmotive von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Um phylogenetische Daten berücksichtigen zu können, wurde daher mit dieser Sequenz gegen die verfügbaren Genome der verschiedenen *Drosophiliden* (*D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willstoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis*, *D. grimshawi*) geblastet (<http://flybase.org/blast/>). Mit Hilfe des Programms ClustalW wurden ein multiples Alignment der zwölf identifizierten Sequenzen durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) und dieses mit dem Programm Unipro UGENE dargestellt (<http://ugene.unipro.ru>). Die Bereiche mit der höchsten Sequenzkonservierung wurden mit dem Programm PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) und dem Programm MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) auf bekannte Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) untersucht. Zusätzlich wurden die konservierten Sequenzabschnitte mit dem Programm STAMP

(<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>) auf mögliche *de novo*-Motive untersucht und diese dann mit verschiedenen TFBS-Datenbanken abgeglichen.

2.2.6 Analyse der 3'-UTR von *pipe*

Um einen möglichen Einfluss von microRNAs auf die Expression von *pipe* zu untersuchen wurden die Vorhersagen der Datenbanken miRBase (<http://www.mirbase.org/>), TargetScan (<http://www.targetscan.org/fly/>), Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) sowie Microcosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) abgeglichen. Es wurden nur miRNA-Kandidaten weiter untersucht, für die eine Bindung an die 3'-UTR von *pipe* vorhergesagt wurde. Dann wurde der Sequenzbereich determiniert, in dem alle vorhergesagten miRNA-Kandidaten binden. Die Basen 130 bis 320 der *pipe* 3'-UTR, welche die Bindestellen für die Kandidaten-miRNAs enthielten, wurden in den Δ UTR-Konstrukten deletiert.

3 Ergebnisse

3.1 Visualisierung der *pipe*-Expression mittels eines EGFP-Pipe-Fusionskonstrukts

Das Expressionsmuster von *pipe* im Verlauf der Oogenese ist sehr dynamisch. *pipe* mRNA-Transkripte können das erste Mal in jungen Eikammern im Stadium 9 in posterioren Follikelzellen nachgewiesen werden. Eine sehr schwache Expression findet sich auch in weiter anterior liegenden Zellen. Im Fortschreiten der Entwicklung, beginnend in Stadium 10, fusionieren diese zwei separaten Domänen zu einem durchgehenden ventralen Streifen. Im späten Stadium 10 verschwindet die *pipe*-Expression ausgehend vom posterioren Pol wieder, bis sie in Follikelzellen von Stadium 11-Eikammern nicht mehr nachweisbar ist (Peri, Technau et al. 2002). Die Dynamik der *LacZ*-Reporterexpression deckt sich bis zum Ende des Stadiums 10 der Oogenese mit der Verteilung der endogenen *pipe* mRNA. Im Gegensatz zu den *pipe* mRNA-Transkripten ist die β -Galactosidase aber auch noch im Stadium 14 mittels Antikörperfärbung nachweisbar (Peri, Technau et al. 2002). Damit reflektiert die β -Galactosidase-Expression zum einen nicht die Expression der *pipe*-mRNA und vermutlich auch nicht die Stabilität und Verteilung des endogenen Pipe-Proteins.

Um eine mögliche Diskrepanz der räumlichen und zeitlichen Expression der mRNA- und Proteinexpression von Pipe und der β -Galactosidase aufzudecken sowie ein markiertes, funktionierendes Pipe-Protein zu Verfügung zu haben, wurde ein N-terminales EGFP-Pipe-Fusionsprotein generiert, das unter Kontrolle des 1,6 kb langen essentiellen *pipe*-Promotoabschnitts in ventralen Follikelzellen exprimiert wird. Hierzu wurde die *pipe* 5'-UTR zwischen den Promotor und den ORF von GFP-Pipe kloniert, da durch das Vorhandensein spezifischer mRNA-Strukturen wie den UTRs möglicherweise die räumliche und zeitliche Stabilität der mRNA oder auch die Proteintranslation genspezifisch reguliert wird. Außerdem könnten Unterschiede in der Proteinstruktur der β -Galactosidase und des EGFP-Pipe-Fusionskonstrukts die jeweilige Protein-Verteilung und -Stabilität beeinflussen. Somit ist die unmittelbare Visualisierung der endogenen Pipe-Expression durch das EGFP-Pipe-Reporterprotein besonders für weitere Analysen der transkriptionellen Regulation relevant. Zusätzlich können funktionale Auswirkungen der erfolgreichen Derepression von Pipe auf die weitere Entwicklung direkt analysiert werden.

3.1.1 Nachweis der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins

Im Gegensatz zur β -Galactosidase reflektiert das EGFP-Pipe-Fusionsprotein neben der endogenen Proteininstabilität auch die subzelluläre Verteilung des Pipe-Proteins. Während die β -Galactosidase eine eindeutig intranukleäre Lokalisation aufweist und auch in späten Oogenesestadien noch sichtbar ist (Peri, Technau et al. 2002), liegt das Fusionsprotein

außerhalb der Follikelzellkerne wahrscheinlich im Golgi-Kompartiment vor und spiegelt die Halbwertszeit des endogenen Proteins wider (Abbildung 3. 1).

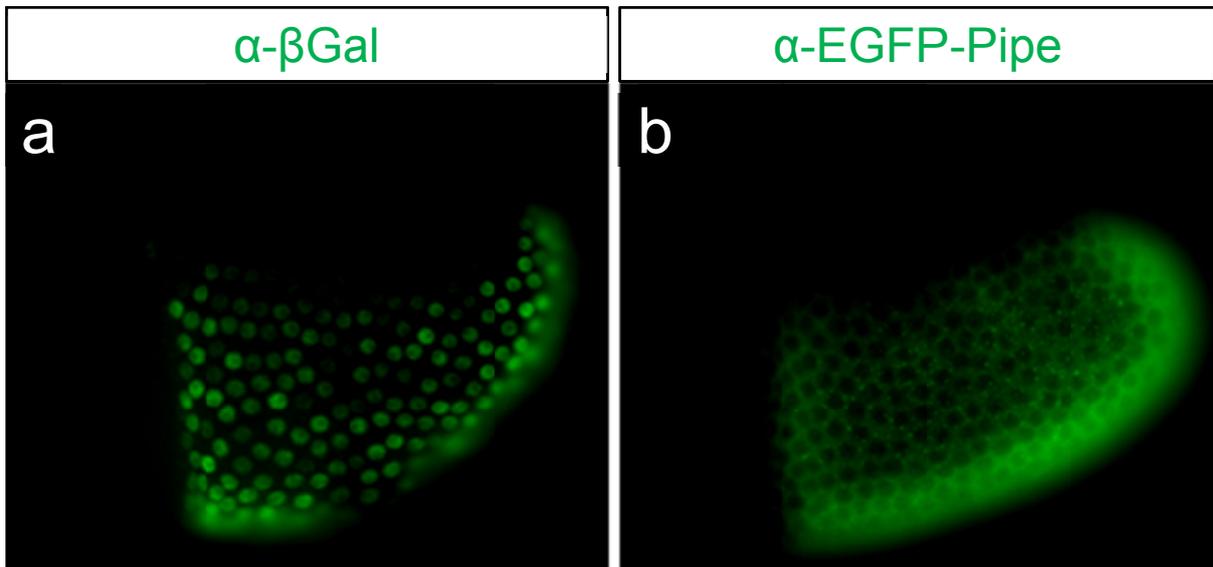


Abbildung 3. 1: Subzelluläre Verteilung des *pipe*-Reporterkonstrukts sowie des EGFP-Pipe-Fusionsproteins (a,b) Lateralsicht von Eikammern in Stadium 10, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a) anti-β-Galactosidase Antikörperfärbung in Ovarien zur Visualisierung des *pipe-LacZ*-Reporterkonstrukts (b) anti-GFP-Antikörperfärbung in Ovarien zur Visualisierung des EGFP-Pipe-Fusionskonstrukts.

Das Golgi-Kompartiment von *Drosophila* ist keine perinukleäre Struktur wie in Säugerzellen, sondern nimmt eine eher ausgedehnte, punktuelle Verteilung im gesamten extranukleären Raum respektive Zytoplasma an (Ripoche, Link et al. 1994). In Zellkultur-Experimenten wurde bereits gezeigt, dass Pipe mit dem nachweislich im Golgi-Kompartiment ansässigen Enzym N-Acetyl-Glucosaminyltransferase (Shima, Haldar et al. 1997) kolo-kalisiert wird (Rabouille, Kuntz et al. 1999). Auch in Follikelzellen ist Pipe in dieser subzellulären Struktur nachweisbar (Sen, Goltz et al. 2000).

Um die genauere subzelluläre Lokalisation des EGFP-Pipe-Fusionsproteins außerhalb des Nukleus in Ovarien transgener Fliegen festzustellen, wurde dieses parallel mit einem im Golgi-Kompartiment vertretenen Protein durch eine Antikörperfärbung visualisiert (Abbildung 3. 2). Das Fusionsprotein EGFP-Pipe ist in allen posterioren und ventralen Follikelzellen vorwiegend im basalen, der Oozyte zugewandten, Bereich der Zellen lokalisiert (a). Auch der Großteil des Golgi-Kompartiments liegt auf dieser Seite (a'). Das EGFP-Pipe-Fusionsprotein (b) wie auch das Golgi-Protein (b') liegen in einer charakteristischen, punktförmigen Struktur vor, was auf deren gemeinsame subzelluläre Lokalisation im Golgi-Kompartiment zurück geführt werden kann (a'',b'').

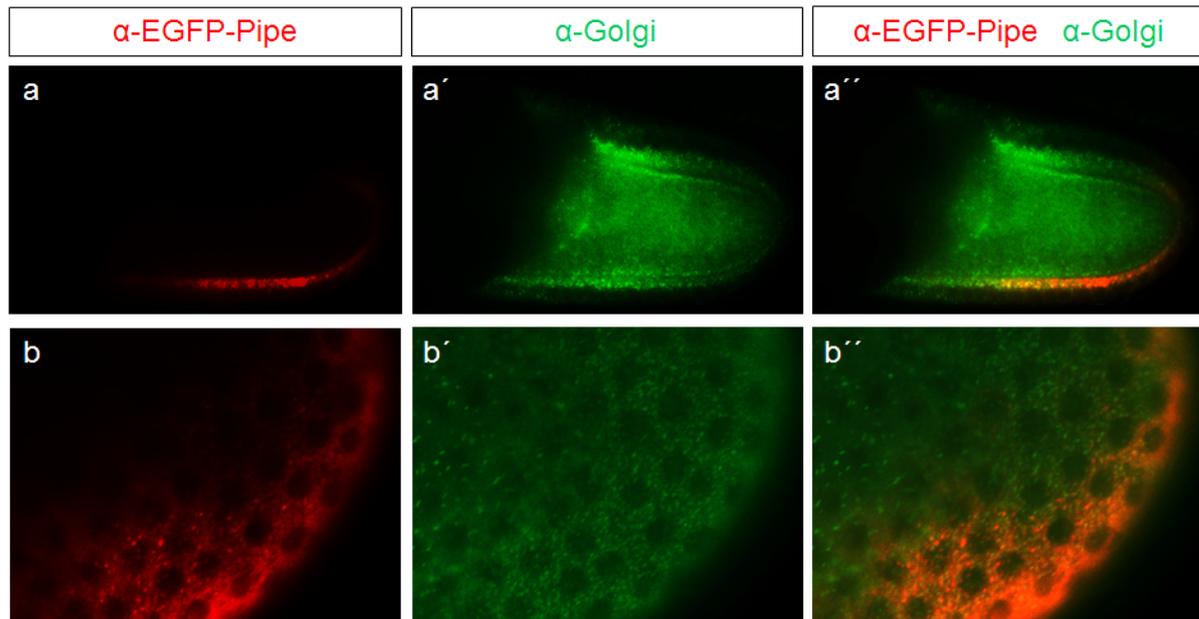


Abbildung 3. 2: Nachweis des EGFP-Pipe Fusionsproteins im Golgi-Kompartiment
 Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. Die subzelluläre Lokalisation des Fusionsprotein EGFP-Pipe unter Kontrolle des *1,6kb-pipe*-Promotors wurde durch eine anti-GFP Antikörperfärbung (a,b) visualisiert, während das Golgi-Kompartiment durch eine anti-Golgi-Antikörperfärbung (a',b') visualisiert wurde. (a'',b'') Überlagerung der Signale der Fluoreszenzkanäle zur Visualisierung der Ko-Lokalisation von EGFP-Pipe und des Golgi-Proteins.

Obwohl das Fusionsprotein höchstwahrscheinlich korrekt lokalisiert wird, konnte durch Expression in Ovarien *pipe*-mutanter Weibchen gezeigt werden, dass es, möglicherweise auf Grund einer Blockade seiner katalytischen Domäne, nicht in der Lage ist seine enzymatische Funktion auszuüben. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine bicistronische mRNA mit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (*IRES*) hergestellt (Fitzgerald and Semler 2009). Theoretisch können dann Pipe und GFP simultan aber als zwei separate Proteine translatiert werden. Leider konnte im Follikelepithel transgener Fliegen keine Expression von EGFP nachgewiesen werden, sodass auch diese Methode nicht zur Visualisierung eines funktionalen Pipe-Proteins verwendet werden konnte.

3.1.2 Vergleich der mRNA- und Fusionsprotein-Verteilung

Zur Visualisierung der räumlichen und zeitlichen Pipe-Proteinverteilung wurden transgene Fliegen generiert, die das EGFP-Pipe-Fusionsprotein unter Kontrolle des 1,6 kb langen essentiellen Promotors (*1,6kb*) im Follikelepithel exprimieren. Da die EGFP-Fluoreszenz zu schwach war, um direkt detektiert zu werden, wurde das Fusionsprotein mit Hilfe einer anti-GFP Antikörperfärbung in Ovarien nachgewiesen (siehe Abbildung 3. 3).

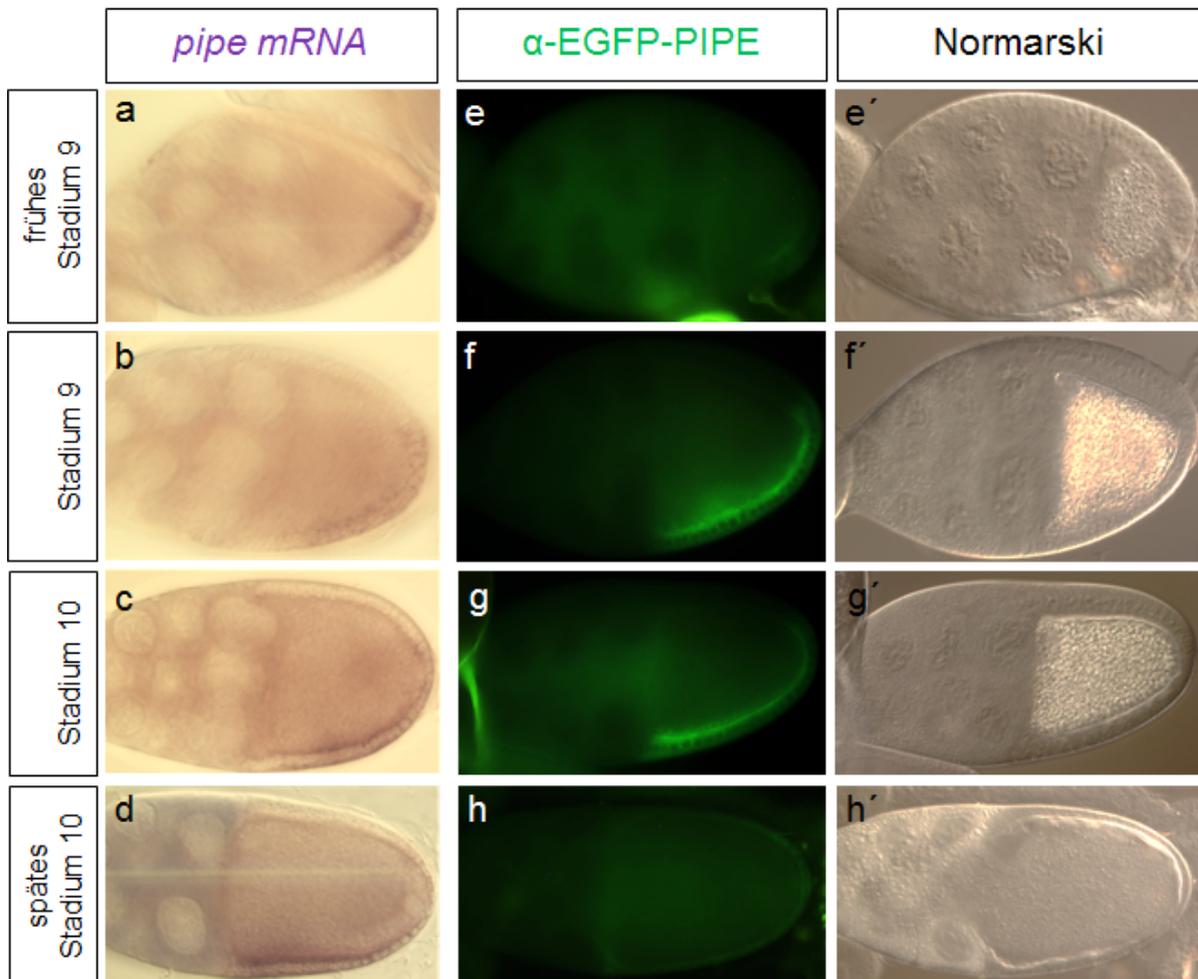


Abbildung 3. 3: Expression der *pipe* mRNA sowie des EGFP-Pipe-Fusionsproteins im Verlauf der Oogenese (a-h') Lateralansicht von Eikammern in verschiedenen Oogenesestadien, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a-d) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der endogenen *pipe* mRNA-Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors. (e-h) anti-GFP Antikörperfärbung zur Visualisierung der Expressiobn des Fusionsproteins unter Kontrolle des essentiellen *1,6kb*-Promotors. (e'-h') Die Normarskiansichten zeigen jeweils die dorsale Lokalisation des Oozytenkerns.

Abweichend von der beobachteten β Gal-Reporterexpression deckt sich die zeitliche Expression des EGFP-Pipe-Fusionsproteins mit der Verteilung der *pipe* mRNA während aller Stadien der Oogenese (siehe Abbildung 3. 3). Zu Beginn des Stadium 9 ist in posterioren ventralen Follikelzellen sowohl eine schwache Expression der *pipe* mRNA als auch des Fusionsproteins nachweisbar (a,e). Während der Stadien 9 und 10 werden die mRNA sowie das Fusionsprotein in einem ununterbrochenen ventralen Zellstreifen exprimiert (b,c,f,g). Im späten Stadium 10 ist die mRNA in Eikammern nur noch anterior lokalisiert (d). Wie auch im Falle des Transkripts kann die Expression des Fusionsproteins im späten Stadium 10 bzw. ab Stadium 11 der Oogenese nicht mehr nachgewiesen werden (h).

Für die Vermittlung der dorsalen Repression von *pipe* ist das Repressorelement *Motiv B* verantwortlich (Technau, Knispel et al. 2012), das ungefähr 1 kb vor dem Transkriptionsstart

im *pipe*-Promotor liegt, mehrere Iroquois-Bindestellen (*IBS*) enthält und vom Transkriptionsfaktor Mirror erkannt und gebunden wird (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012). Durch die Deletion des *Motiv B* aus dem essentiellen Promotor wird der *LacZ*-Reporter in Ovarien transgener Fliegen nahezu uniform im gesamten Follikel epithel exprimiert (vgl. Abbildung 1. 4). Um auch in diesem Fall die Visualisierung der endogenen Pipe-Proteinverteilung zu ermöglichen, wurden transgene Fliegen generiert, die das EGFP-Pipe-Fusionsprotein unter Kontrolle des essentiellen 1,6 kb langen Promotors, aus dem, wie im oben beschriebenen Reporterkonstrukt, das Repressorelement *Motiv B* deletiert war (*1,6ΔB*), exprimieren.

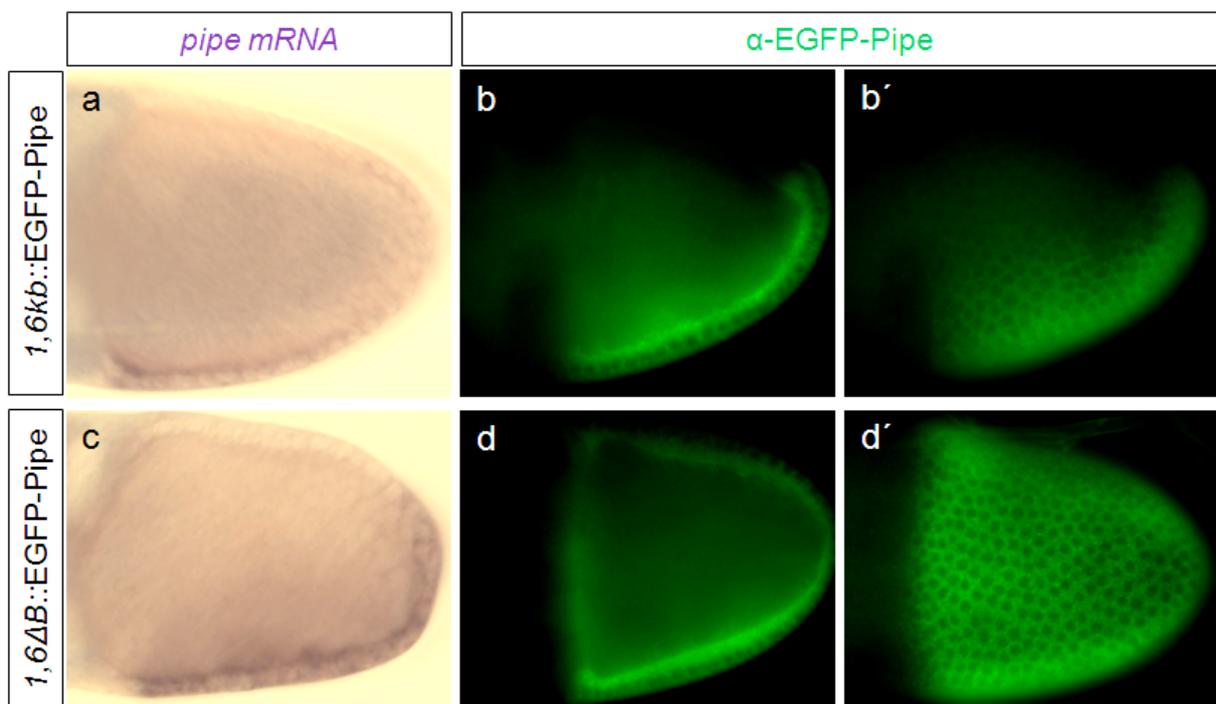


Abbildung 3. 4: Expression des EGFP-Pipe-Fusionsproteins unter Kontrolle des intakten und des intern deletierten Promotors (a-d') Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10 A, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a,c) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der endogenen *pipe*- und *eGFP-pipe* mRNA-Expression unter Kontrolle des intakten *1,6kb*-Promotors (a) sowie unter Kontrolle des *1,6ΔB*-Promotors (c). (b-d') anti-GFP- Antikörperfärbung zur Visualisierung der Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des intakten *1,6kb*-Promotors (b,b') sowie unter Kontrolle des *1,6ΔB*-Promotors (d,d').

Unter Kontrolle des endogenen *1,6kb-pipe*-Promotors wird die mRNA in einem WT-ähnlichen Muster in ventralen Follikelzellen exprimiert (Abbildung 3. 4 a). Das EGFP-Pipe-Fusionsprotein ist ebenfalls nur in den ventralen Follikelzellen nachweisbar (b,b'). Unter Kontrolle des *1,6ΔB*-Promotors weitet sich die Expression des Reporterproteins aus, wobei aber das Fluoreszenzsignal in dorsalen Follikelzellen immer noch schwächer ist als im ventralen Teil der Eikammer (d,d'). Gleiches gilt auch für die Verteilung der mRNA (c).

Überraschenderweise führt die Deletion des *Motiv B* nicht zu der erwarteten nahezu uniformen Derepression von *pipe*, die in der β Gal-Reporterlinie zu beobachten war.

3.2 Post-transkriptionelle Regulation von *pipe* durch microRNAs

Die Deletion der Repressorbindestelle aus dem Promotor von *pipe* führt nicht zur vollständigen Derepression von *pipe* im Follikelepithel. Vielmehr ist immer noch eine dorsale Repression erkennbar. Dies gilt für die Expression des *LacZ*-Reportergens und ist besonders auffällig im Falle der oben beschriebenen EGFP-Pipe-Fusionskonstrukte unter Kontrolle des *1,6 Δ B*-Promotor in transgenen Fliegen, in deren Eikammern die Fluoreszenz des GFP auf der dorsalen Seite besonders im mittigen Teil der AP-Achse sowie am posterioren Pol eindeutig schwächer ist als im übrigen Follikelepithel (vgl. Abb. 3. 4 d,d'). Noch offensichtlicher ist dieser Effekt auf Ebene der mRNA-Verteilung (vgl. Abb. 3. 4 c). Gleiches wurde auch beobachtet, wenn der Promotor, aus dem das *Motiv B* deletiert war, verwendet wurde, um funktionales *pipe* zu exprimieren. Auch in diesem Fall war *pipe* nur in ventralen Follikelzellen und nicht uniform nachweisbar, sodass die Nachkommen keine erkennbaren Defekte in Bezug auf die dorsoventrale Musterbildung aufwiesen (persönliche Kommunikation mit M. Technau). Die in der *1500- Δ B*- β -Gal Reporterlinie beobachtete schwächere dorsale Repression im Follikelepithel und die Proteinpräsenz auch in späten Oogenesestadien, die im Gegensatz zu EGFP-Pipe steht (vgl. Abbildung 1. 4), kann entweder auf einer höheren Proteinstabilität der β -Galactosidase oder auf einer höheren *LacZ*-mRNA-Stabilität und –translationsrate im Vergleich zu EGFP-Pipe respektive *pipe* beruhen. Da für die Expression der *pipe*-mRNA, des EGFP-Pipe-Fusionskonstrukts sowie der *LacZ*-Reporterlinie jeweils der gleiche Promotor verwendet wurde, sind die beobachteten Unterschiede möglicherweise durch post-transkriptionelle Einflüsse bedingt.

An der post-transkriptionellen Genregulation, welche in Ovarien von *Drosophila* eine große Rolle spielt, können unter anderem microRNAs (miRNA) beteiligt sein (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001; Bartel 2004; He and Hannon 2004; Filipowicz, Jaskiewicz et al. 2005; Reich, Snee et al. 2009).

Das Primärtranskript (pri-miRNA) eines miRNA-Gens wird von der RNase III (Drosha) und dem dsRNA-Bindeprotein Pasha in die pre-miRNA prozessiert (Gregory, Chendrimada et al. 2006). Diese wiederum wird im Zytoplasma durch das Enzym Dicer in 17-24 nt kurze ds-miRNAs zerschnitten (Lund and Dahlberg 2006), welche vom dsRNA-Bindeprotein Loquacious entwunden und einzelsträngig gemacht werden (Saito, Ishizuka et al. 2005). Die reife miRNA wird in den RNA induced silencing complex (miRISC) inkorporiert (Rana 2007) und bindet dann Sequenzen in Introns, in der 5'-UTR oder in der 3'-UTR der Ziel-mRNA (Zhang and Su 2009). Abhängig von der Komplementarität der *Seed*-Sequenz, welche meist

die Basen 2-7 der microRNA umfasst, wird die Translation der Ziel-mRNA entweder gehemmt oder die mRNA degradiert (Lewis, Burge et al. 2005; Wienholds and Plasterk 2005).

Da die Unterschiede bezüglich der mRNA-Stabilität und –Verteilung von *LacZ* und *pipe* möglicherweise durch spezifische miRNA-Einflüsse begründet sind, wurde deren Beteiligung an der Regulation von *pipe* untersucht.

3.2.1 Identifizierung potentieller *pipe* 3'-UTR bindender microRNAs

Es gibt zahlreiche Datenbanken, die Vorhersagen über mögliche Interaktionen von microRNAs und mRNAs enthalten. Da bisher, abhängig vom verwendeten Vorhersage-Algorithmus, rund 110 - 150 miRNAs identifiziert wurden (Lai, Tomancak et al. 2003; Ruby, Stark et al. 2007) und jede dieser miRNAs viele verschiedene Sequenzen in der gleichen mRNA aber auch in unterschiedlichen mRNAs binden und somit nicht nur eines sondern hunderte verschiedene Zielgene regulieren könnte, sind nur die allerwenigsten Interaktionen validiert (Liu, Landreh et al. 2012; Weng and Cohen 2012). Um Kandidaten-microRNAs, die möglicherweise an die 3'-UTR von *pipe* binden, zu identifizieren, wurden die Vorhersagen potentieller miRNA:mRNA-Interaktionen verschiedener Datenbanken abgefragt. Da diese Vorhersagen auf unterschiedlichen Algorithmen beruhen, überschneiden sich die Ergebnisse nur in wenigen Fällen. Die jeweiligen Vorhersagen der vier Datenbanken miRBase/Microcosm (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones, Grocock et al. 2006; Griffiths-Jones, Saini et al. 2008; Kozomara and Griffiths-Jones 2011), TargetScanS (Lewis, Burge et al. 2005; Kheradpour, Stark et al. 2007; Ruby, Stark et al. 2007), Pictar (Grun, Wang et al. 2005) sowie Mirte (www.russelllab.org) sind in Tabelle 3. 1 aufgeführt. Die in Tabelle 3. 1 rot markierten microRNAs sind von mindestens zwei, im Falle von *mir-11* sogar von drei verschiedenen Algorithmen vorhergesagt worden. Ansonsten waren alle anderen microRNAs nur in jeweils einer der vier Datenbanken als potentielle Kandidaten für die post-transkriptionelle Regulation von *pipe* aufgeführt. Für die grau markierten microRNAs wird zwar eine Bindung an die 3'-UTR von *pipe* vorhergesagt, die pri-microRNA selbst war aber zum Zeitpunkt der Abfrage noch nicht annotiert. Die microRNA *mir-283* liegt in einem Cluster mit *mir-12* und *mir-304* vor, *mir-306* und *mir-79*, für die jeweils eine Bindung an die *pipe* 3'-UTR vermutet wird, liegen in einem Cluster mit *mir-9* vor.

Tabelle 3.1: Übersicht über die von verschiedenen Datenbanken vorhergesagten *pipe* 3'-UTR bindenden microRNAs

MIRTE	TargetScanS	PICTAR	MICROCOSM	
			<i>mir-8</i>	
<i>mir-11</i>		<i>mir-11</i>	<i>mir-11</i>	
			<i>mir-33</i>	
			<i>mir-79</i>	cluster with 306/9
	<i>mir-190</i>			
	<i>mir-283</i>	<i>mir-283</i>		cluster with 12/304
		<i>mir-289</i>		
<i>mir-306</i>			<i>mir-306</i>	cluster with 79/9
<i>mir-315</i>		<i>mir-315</i>		
	<i>mir-979</i>			
	<i>mir-1013</i>			
			<i>mir-bantam</i>	

3.2.2 Expression der Kandidaten-microRNAs in Embryonen und Ovarien

Um zu prüfen, welche Kandidaten möglicherweise an der dorsalen Repression von *pipe* beteiligt sind, wurde zuerst untersucht ob und in welchem Muster die einzelnen miRNAs im Follikel epithel exprimiert werden.

Die Abfrage der vier verschiedenen Datenbanken ergab zwölf potentielle microRNAs, die an der post-transkriptionellen Regulation von *pipe* beteiligt sein könnten. Im Falle der annotierten miRNAs *mir-8*, *mir-11*, *mir-33*, *mir-79/306* (*mir-cluster*), *mir-283*, *mir-289*, *mir-315* und *mir-bantam* wurde versucht, deren jeweilige Primärtranskripte im Follikel epithel mittels *in-situ*-Hybridisierung nachzuweisen. Als Kontrolle für die Spezifität der RNA-Sonden wurde außerdem die Expression der microRNAs in Embryonen visualisiert, da hier in einigen Fällen die Expressionsmuster bereits bekannt waren (Aboobaker, Tomancak et al. 2005). Für die microRNAs *mir-8* und *mir-283* konnte ein spezifisches Expressionsmuster in Embryonen sowie in Ovarien nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3. 5).

mir-8 wird im Embryo in den Speicheldrüsenplakoden, dem Mesoderm und Teilen des Ektoderms exprimiert (Abb. 3. 5 a), *mir-283* im Vorderdarm, dem hinteren Mitteldarm, dem Enddarm, den Speicheldrüsen und Teilen des peripheren Nervensystems (Abb. 3. 5 c) vgl. (Aboobaker, Tomancak et al. 2005). Beide microRNAs werden im Follikel epithel uniform exprimiert (Abb. 3. 5 b, d). Während die Expression von mRNAs typischerweise im Zytoplasma nachgewiesen werden kann, zeigt die beobachtete paarige, punktförmige Färbung in den Follikelzellkernen, dass durch die verwendeten Sonden die noch nicht

prozessierten Primärtranskripte der miRNAs nachgewiesen wurden (Abb. 3. 5 b',b'',d',d'') vgl. (Aboobaker, Tomancak et al. 2005).

mir-bantam, *mir-11* sowie *mir-315* werden im Embryo in einem charakteristischen Muster entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos respektive im ventralen Nervensystem exprimiert (vgl. Anhang Abbildung A 5) und (Aboobaker, Tomancak et al. 2005). In Ovarien konnten die Transkripte hingegen nicht nachgewiesen werden. Die Expression von *mir-33*, *mir-289* und dem *mir-79/306/9-Cluster* konnte weder in Embryonen noch in Ovarien nachgewiesen werden. Von den zwölf vorhergesagten microRNAs könnten somit *mir-8* sowie *mir-283* an der post-transkriptionellen Regulation von *pipe* beteiligt sein.

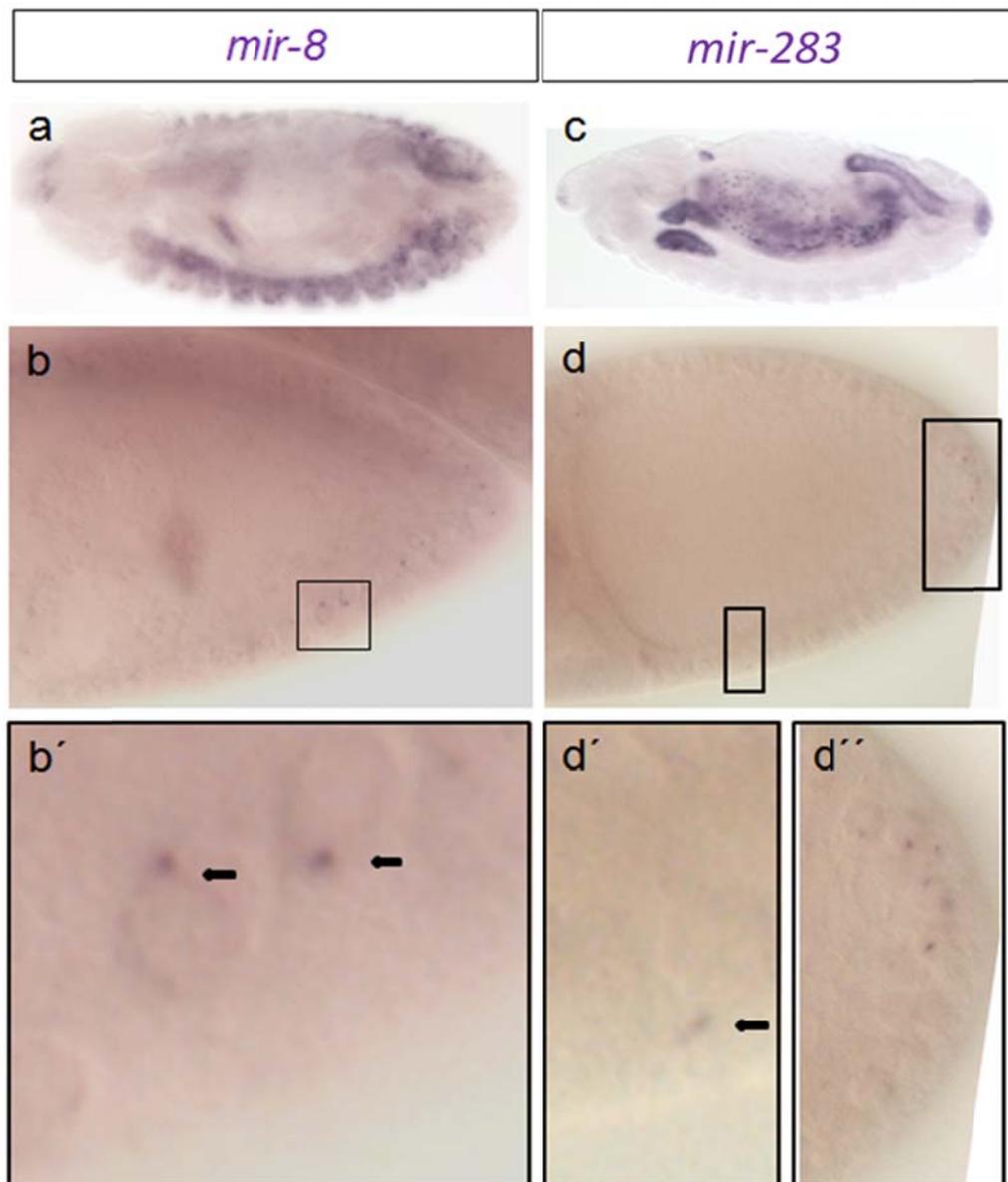


Abbildung 3. 5: Expression von *mir-8* und *mir-283* in Embryonen und Ovarien (a,c) Dorso-Lateralansicht von Embryonen während der Gastrulation sowie (b,d) Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10 der Oogenese, die mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a, b, b') *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der Transkripte von *mir-8* und (c,d, d', d'') *mir-283*.

3.2.3 Deletion der microRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR von *pipe*

Da die microRNAs *mir-8* und *mir-283* im Follikelepithel exprimiert werden, wurde deren möglicher post-transkriptioneller Einfluss auf *pipe* während der Oogenese untersucht. Die potentiellen Bindesequenzen der miRNAs *mir-8* und *mir-283* liegen zwischen den Basen 227–242 respektive 219–225 sowie 251–257 der *pipe* 3'-UTR (Abbildung 3. 6).

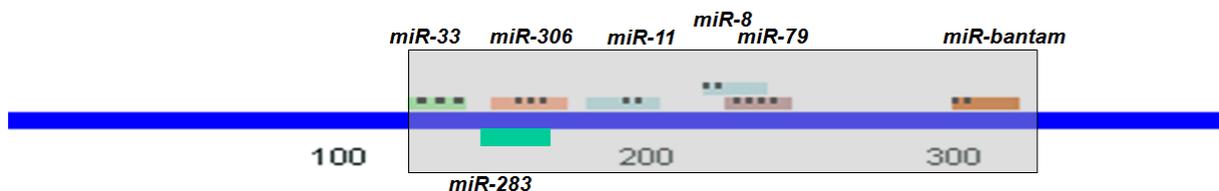


Abbildung 3. 6: Schematische Darstellung der *pipe* 3'-UTR mit potentiellen miRNA-Bindestellen Die Region zwischen 130 bis 320 bp der *pipe* 3'-UTR enthält sieben potentielle Bindestellen, welche von acht verschiedenen miRNAs gebunden werden könnten. Die graue Box markiert das Fragment, das in den Δ UTR-Konstrukten deletiert ist.

Da der angegebene Bindungsbereich nicht unbedingt verlässlich ist und die Vorhersagen der *pipe* 3'-UTR bindenden microRNAs eventuell unvollständig sind, wurde ein Sequenzbereich in dem alle von den vier Datenbanken aufgeführten miRNAs binden (130 - 320) aus der 3'-UTR deletiert. Die Auswirkung der Deletion der Bindestellen wurde mit Hilfe der zuvor verwendeten EGFP-Pipe-Fusionskonstrukte visualisiert (Abbildung 3. 7).

Hier zeigt sich, dass sich die Verteilung der mRNA von *pipe* sowie die des EGFP-Pipe-Fusionsproteins nach Deletion der miRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR in räumlicher Hinsicht nicht verändert (a,c). Statt einer beinahe vollständigen dorsalen Derepression, wie diese in der 1500 Δ B-*LacZ*-Reporterlinien erkennbar ist (vgl. Abb. 1. 4), bleibt die *pipe*-Expression in dorsalen Follikelzellen sowohl unter Kontrolle des 1,6kb-Promotors sowie des deletierten 1,6 Δ B Promotors trotz Deletion der miRNA-Bindestellen reprimiert (b,d).

Auffällig ist, dass in Eikammern von Fliegen, in denen die Konstrukte mit deletierten miRNA-Bindestellen exprimiert werden (vgl. Abb. 3. 7) eine stärkere EGFP-Expression zu beobachten ist als in Eikammer von Fliegen in denen das EGFP-Pipe-Konstrukt mit intakter 3'-UTR exprimiert wird (vgl. Abb. 3. 4). Somit führt die Deletion potentieller miRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR statt zu einer Aufhebung der dorsalen Repression möglicherweise zu einer uniformen Stabilisierung der *eGFP-pipe*-mRNA und in Folge dessen zu einer höheren Translationsrate im gesamten Follikelepithel.

Um diese, durch die Deletion der miRNA-Bindestellen, erreichte Erhöhung der Translationsrate und somit der EGFP-Pipe-Proteinpräsenz in Eikammern zu verifizieren, wurden zum einen die Belichtungszeiten verglichen und zudem versucht, die EGFP-Expression in den verschiedenen transgenen Linien mittels Western Blot-Analyse relativ zu quantifizieren. Die mRNA- und Protein-Expression ist in beiden Δ UTR-Konstrukten eindeutig stärker, als in den

EGFP-Pipe-Konstrukten mit intakter 3'-UTR (vgl. Abb. 3. 4 und Abb. 3. 7), was neben der Hintergrundfluoreszenz in den Nährzellen auch an der benötigten Belichtungszeit (1,6kb::EGFP-Pipe: 1327 ms vs. 1,6kb::EGFP-Pipe-ΔUTR: 110 ms; 1,6ΔB::EGFP-Pipe: 1777 ms vs. 1,6ΔB::EGFP-Pipe-ΔUTR: 632 ms) erkennbar war. Leider konnte die Änderung der Protein-Expression nicht quantifiziert werden, da das EGFP-Pipe-Fusionsprotein selbst bei Verwendung verschiedener anti-GFP Antikörper auf Western Blots nicht detektierbar war.

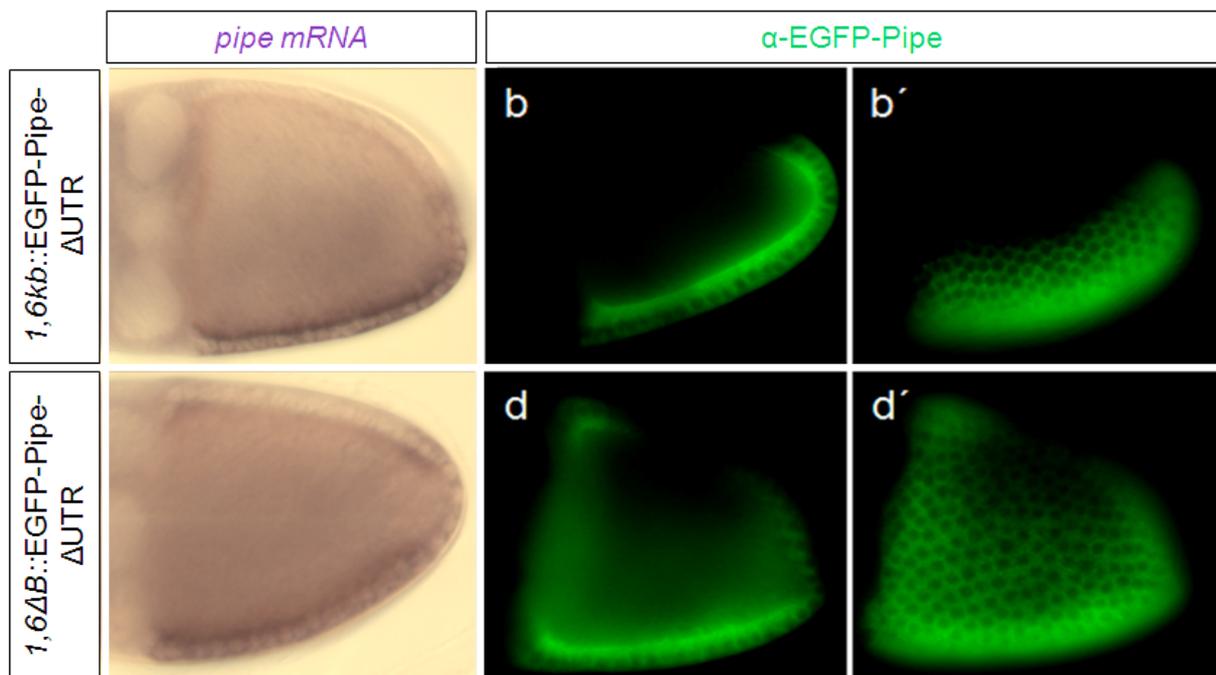


Abbildung 3. 7: Expression des EGFP-Pipe-Fusionskonstrukts nach Deletion der miRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR (ΔUTR) unter Kontrolle des intakten und des intern deletierten Promotors (a-d') Lateralansicht von Eikammern in Stadium 10 (a,c) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der endogenen *pipe*-mRNA- sowie *eGFP-pipe*-mRNA-Expression unter Kontrolle des essentiellen 1,6kb-Promotors (a) sowie unter Kontrolle des 1,6ΔB-Promotors (c) aus dem das potentielle Repressorelement *Motiv B* deletiert wurde. (b,d') anti-GFP Antikörperfärbung zur Visualisierung der Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des intakten 1,6kb-Promotors (b, b') sowie unter Kontrolle des 1,6ΔB-Promotors (d,d').

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Deletion der microRNA-Bindestellen aus der mRNA von *pipe* zeigt, dass die bisher getesteten microRNAs nicht an der dorsalen Repression von *pipe* beteiligt sind. Zum einen sind die möglichen Kandidaten miRNAs nicht asymmetrisch respektive nur in dorsalen Follikelzellen präsent, sondern uniform. Zum anderen ändert sich die räumliche Verteilung der *pipe*-mRNA und des EGFP-Pipe Fusionsproteins nicht, sondern vermutlich nur deren Quantität. Die nahezu uniforme und länger andauernde Präsenz des β-Galactosidase-Reporters im Gegensatz zum EGFP-Pipe-Fusionsprotein kann daher nur durch Unterschiede in der Stabilität der beiden Proteine erklärt werden.

3.3 Analyse der transkriptionellen Regulation von *pipe*

Da der Repressor Mirror erst kürzlich als notwendiger Faktor für die dorsale Repression von *pipe* identifiziert wurde und dieser zudem wahrscheinlich alleine nicht ausreichend ist, werden nachfolgend bereits vorher durchgeführte Experimente zur Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren sowie weiteren *cis*-regulatorischen Sequenzelementen im *pipe*-Promotor beschrieben.

3.3.1 Eine Isolierung des *pipe*-Repressors mittels DNA-Affinitätschromatographie war nicht möglich

Um einen möglichen transkriptionellen Repressor zu isolieren, der an das *Motiv B* bindet, wurde eine DNA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Mittels eines *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) war zuvor gezeigt worden, dass Proteine aus Ovarien- und Embryonalextrakten an die Sequenz des *Motiv B* binden können (Technau, Knispel et al. 2012). Mit Hilfe des μ MACS™ FactorFinder Kit (Miltenyi Biotec) wurde daher versucht einen spezifischen Transkriptionsfaktor zu isolieren.

Hierzu wurde ein Biotin-gekoppeltes DNA-Oligonukleotid, bestehend aus der TFBS *Motiv B*, an magnetische Streptavidin-Beads gebunden. Die Proteinextrakte aus Embryonen, welche den potentiellen TF enthielten, wurden zu den Beads gegeben. Im Idealfall bindet der gesuchte TF nun spezifisch an die Biotin-markierte DNA. Nach Auswaschen der ungebundenen und unspezifisch gebundenen Proteine sollte zuletzt der spezifisch gebundene TF eluiert werden.

Leider konnte mit Hilfe der DNA-Affinitätschromatographie aber kein transkriptioneller Repressor von *pipe* isoliert werden, da trotz Anwendung verschiedenster Wasch- und Elutionsbedingungen keine Anreicherung eines respektive mehrerer spezifischer Proteine möglich war.

3.3.2 Einfluss der ETS-verwandten Transkriptionsfaktoren auf die *pipe*-Expression

Die Repression von *pipe* in dorsalen Follikelzellen entlang der gesamten AP-Achse der Eikammern resultiert aus der Aktivierung des EGFR-Signalwegs in diesen Zellen (Amiri and Stein 2002; Peri, Technau et al. 2002; Fuchs, Cheung et al. 2012; Technau, Knispel et al. 2012). Dies konnte unter anderem durch die Analyse von Follikelzellklonen gezeigt werden, die mutant für Komponenten des EGFR-Signalwegs sind (Peri, Technau et al. 2002). Wie für die Transkriptionsfaktoren CF2, Ttk oder Gro wurde auch für die ETS-Domänen-Proteine Yan und Pointed mittels GFP-markierter *loss-of-function* Klone ein repressorischer Einfluss auf die Expression von *pipe* ausgeschlossen (Technau, Knispel et al. 2012). Neben den

bereits gut charakterisierten Ets-Genen *yan* und *pnt* existieren aber noch mindestens sechs weitere Ets-verwandte Gene in *Drosophila*, denen essentielle Rollen in verschiedenen Entwicklungsprozessen zugesprochen werden (Hsu and Schulz 2000).

Um eine mögliche Beteiligung eines dieser Ets-verwandten Gene an der Regulation von *pipe* zu überprüfen, wurde die Expression von *Eip74EF* (*E74*), *D-elg* (*Ets97D*), *D-ets-3* (*Ets65A*), *D-ets-4* (*Ets98B*), *Ets96B* oder *D-ets-6* (*Ets21C*) im Follikelepithel mittels *in-situ*-Hybridisierung visualisiert. Außerdem wurde der mögliche Einfluss der Ets-verwandten Gene auf die Transkription von *pipe* mittels Überexpression des konstitutiv aktiven Repressors Yan sowie RNAi-Experimenten untersucht.

3.3.3 Überexpression von Yan^{act} modifiziert die *pipe*-Expression

Der ETS-Domänen-Transkriptionsfaktor Pointed (O'Neill, Rebay et al. 1994) ist an der Musterbildung im Follikelepithel beteiligt, wobei die als Transkriptionsaktivator agierende Spleißvariante Pnt-P2 (Klamt 1993; Brunner, Ducker et al. 1994; O'Neill, Rebay et al. 1994) hier EGFR-abhängig aktiviert wird. Auch das repressorisch wirkende ETS-Protein Yan wird durch den EGFR-Signalweg reguliert; Yan wird durch die MAPK-vermittelte Phosphorylierung aber deaktiviert. Da Pnt und Yan an homologe *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen verschiedener Zielgene binden können (Lai and Rubin 1992; O'Neill, Rebay et al. 1994), werden die betroffenen Gene in Abwesenheit eines EGFR-Signals durch Yan reprimiert. Die Bindung der verschiedenen ETS-verwandten Transkriptionsfaktoren in der *cis*-regulatorischen Region der Zielgene erfolgt an Sequenzen mit einem zentralen GGAA/T-Motiv (Sharrocks, Brown et al. 1997), die wiederum durch die Bindung von Yan blockiert werden können. Um eine mögliche Beteiligung der ETS-verwandten Transkriptionsfaktoren an der Regulation von *pipe* zu untersuchen, wurde eine konstitutiv aktive Version des Repressors Yan (*UAS-Yan^{act}*) (Rebay and Rubin 1995) mit Hilfe unterschiedlicher *Gal4*-Treiberlinien in verschiedenen Bereichen des Follikelepithels überexprimiert (Abbildung 3. 8 d,e,f).

Das mutierte Yan kann nicht mehr MAPK-abhängig phosphoryliert werden und verhindert durch die dauerhafte Bindung an die *cis*-regulatorischen Bereiche der Zielgene deren Aktivierung durch die potentiellen ETS-Domänen-Transkriptionsaktivatoren *Eip74EF* (*E74*), *D-elg* (*Ets97D*), *D-ets-3* (*Ets65A*), *D-ets-4* (*Ets-98B*), *Ets96B* oder *D-ets-6* (*Ets21C*).

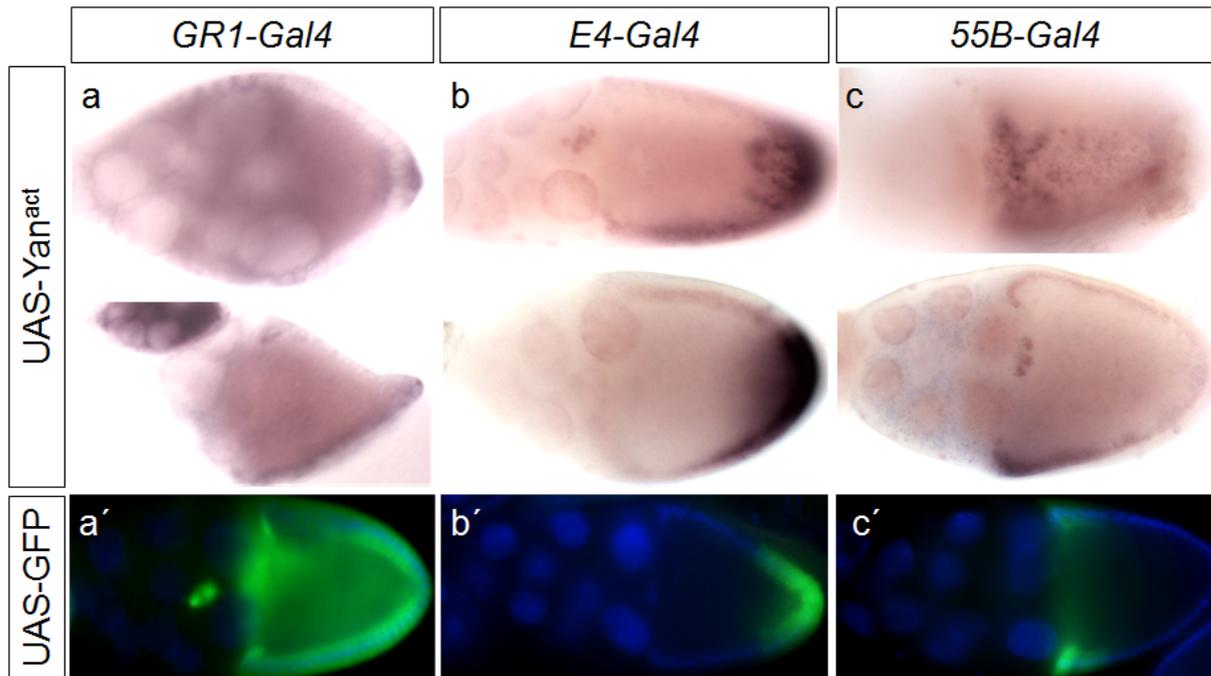


Abbildung 3. 8: Einfluss von konstitutiv aktivem Yan auf die Expression von *pipe* (a-c') Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10, die mit dem anterioren Pol nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a-c) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der *pipe* mRNA-Expression unter Einfluss von konstitutiv aktivem Yan (Yan^{act}). (d-f) anti-GFP Antikörperfärbung zur Visualisierung der Expressionsdomänen der verschiedenen Gal4-Treiberlinien im Follikel-epithel.

Die uniforme Überexpression des konstitutiv aktiven Repressors Yan mit der im gesamten Follikel-epithel aktiven *Cy2-Gal4*-Treiberlinie verhinderte die korrekte Oogenese, sodass überhaupt keine intakten Eikammern gebildet wurden. Auch die Überexpression mit *GR1-Gal4* beeinflusste die Integrität der Ovariolen, wobei insbesondere starke Defekte bei der Bildung der Stielzellen zwischen den einzelnen Eikammern beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). In einigen Fällen wurden aber intakte Eikammern gebildet. In diesen konnte das *pipe*-Transkript in den ventralen und posterioren Follikelzellen in einem Wildtyp-ähnlichen Expressionsmuster nachgewiesen werden (Abbildung 3. 8 a). Die Überexpression von Yan^{act} in begrenzten Regionen des Follikel-epithels mit der anterior aktiven *55B-Gal4*-sowie der posterior aktiven *E4-Gal4*-Treiberlinie führte zu einer verstärkten Expression von *pipe* in den von der Überexpression von Yan^{act} betroffenen Follikelzellen (Abbildung 3. 8 b,c). Der beobachtete Effekt – die Derepression von *pipe* – beruht wahrscheinlich auf der Yan-vermittelten Repression eines Repressors von *pipe*. Durch die Yan^{act}-abhängige Blockade der gemeinsamen Bindestelle kann die Expression des Repressors nun nicht mehr in ausreichendem Maße durch einen der anderen ETS-verwandten Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. In diesem Fall erhöht sich die Expression von *pipe* quantitativ, während das Expressionsmuster unverändert bleibt.

3.3.4 Expression der Ets-Gene im Follikelepithel

Da die Blockade von Aktivator-Bindestellen der ETS-verwandten Transkriptionsfaktoren in einem potentiellen *cis*-regulatorischen Modul eines Repressors von *pipe* und die daraus resultierende Erhöhung der *pipe* mRNA-Abundanz implizieren, dass möglicherweise eines der Ets-verwandten Gene indirekt an der Regulation der *pipe*-Expression beteiligt ist, wurde deren Expression im Follikelepithel mittels *in-situ*-Hybridisierung untersucht. Als Kontrolle für die Spezifität der verwendeten Sonden wurde zusätzlich die Expression in Embryonen dokumentiert.

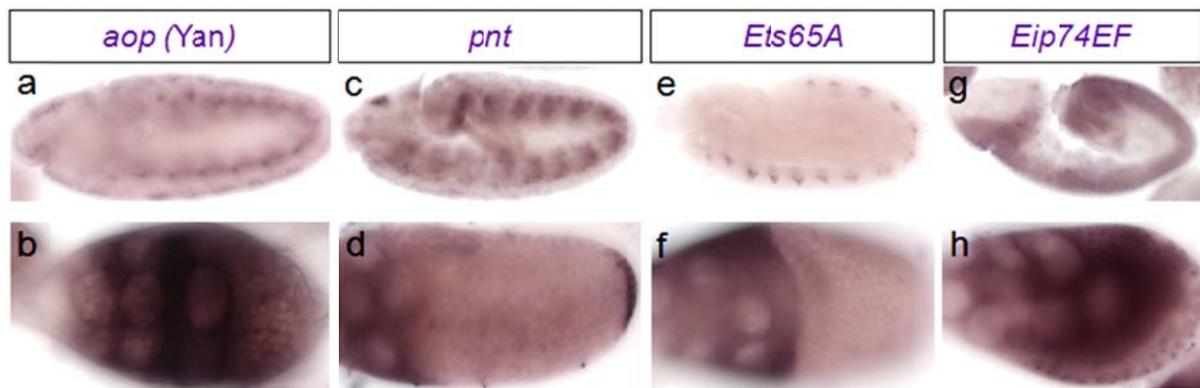


Abbildung 3. 9: Expression verschiedener Ets-Gene in Embryonen und Ovarien (a,c,e,g) Lateralansicht von Embryonen während der Gastrulation sowie (b,d,f,h) Lateralansicht von Eikammern in unterschiedlichen Oogenesestadien, die mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a-h) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der Transkripte von *aop* (a,b), *pnt* (c,d), *Ets65A* (e,f) und *Eip74EF* (g,h).

Der Repressor Yan wird im Embryo in mesodermalen und ektodermalen Zellen sowie im Follikelepithel der Eikammern uniform exprimiert. Die Transkripte von *pnt* konnten in Mesoderm sowie in der Kopfregion des Embryos nachgewiesen werden. In Ovarien wird *pnt* in anterior-dorsalen Follikelzellen exprimiert (Hsu and Schulz 2000) und kann zusätzlich in posterioren Follikelzellen nachgewiesen werden. Während nur *Ets65A* im Gegensatz zu *Eip74EF* ein spezifisches Expressionsmuster im Embryo aufweist, werden beide schwach in allen Follikelzellen exprimiert (Abb. 3. 9). Obwohl die Expression von *D-elg* (*Ets97D*) nicht nachgewiesen werden konnte, ist bekannt, dass auch dieses Gen in Ovarien exprimiert wird und an der Follikelzellmigration sowie Musterbildung in der Eikammer während der Oogenese beteiligt ist (Gajewski and Schulz 1995). Die Expression der Ets-Gene *D-ets-4* (*Ets-98B*), *Ets96B* oder *D-ets-6* (*Ets21C*) konnte in Eikammern nicht detektiert werden.

3.3.5 RNAi-Experimente

Da mehrere der Ets-Gene im Follikelepithel exprimiert werden und im Fall von *D-ets-4*, *Ets96B* und *D-ets-6* trotz fehlendem Nachweis der Transkripte deren Expression in Ovarien

nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, wurden alle Ets-Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) im Follikelepithel (Zhu and Stein 2004; Dietzl, Chen et al. 2007) gezielt ausgeschaltet, um die veränderte *pipe*-Expression möglicherweise auf die Funktion eines spezifischen ETS-Transkriptionsaktivators zurück führen zu können.

Mittels unterschiedlich starker *Gal4*-Treiberlinien wurden die *UAS-RNAi*-Konstrukte zusammen mit einem *UAS-Dicer*-Konstrukt aus der VDRC-Sammlung (*Vienna Drosophila RNAi Center*) (Dietzl, Chen et al. 2007) uniform im Follikelepithel überexprimiert. Zwar war keine *UAS-RNAi*-Linie zur Herunterregulierung der Yan-Expression erhältlich, es ist aber bereits gezeigt worden, dass Yan-negative Follikelzellklone zumindest die Expression eines *LacZ*-Reporters unter Kontrolle des *pipe*-Promotors nicht beeinflussen (Technau, Knispel et al. 2012). Auch im Falle der anderen sieben Ets-Gene konnte nach RNAi keine Veränderung der *pipe*-Expression in Ovarien festgestellt werden. Auch in den Kutikula-Präparaten von Nachkommen dieser Fliegen waren keine Defekte der dorsoventralen Achse erkennbar. Zwar war die Lethalität der Nachkommen im Vergleich zum Wildtyp erhöht, dies ist aber wahrscheinlich auf unspezifische Off-Target-Effekte zurück zu führen (Kulkarni, Booker et al. 2006; Moffat, Reiling et al. 2007; Seinen, Burgerhof et al. 2010; Seinen, Burgerhof et al. 2011). Die nach Überexpression der RNAi-Konstrukte *UAS-D-ets-4*, *-D-ets-6* und *-Ets65A* beobachtete Fusion der Basis der dorsalen Anhänge (vgl. Anhang Abbildung A 1) weist auf eine mögliche Beteiligung dieser Ets-Gene an dem Prozess der Initiation und Bildung dieser Strukturen hin (siehe Tab. 3. 2).

Tabelle 3. 2: Effekte der Überexpression der *UAS-RNAi*-Linien im Follikelepithel

Ets-Gen (<i>UAS-RNAi</i>)	dorsale Anhänge	Kutikula-Phänotyp	embryonale Lethalität	veränderte <i>pipe</i> -Expression
<i>D-ets-4/Ets98B</i>	DA-Basis fusioniert	nein	21%	nein
<i>D-elg/Ets97D</i>	normal	nein	67%	nein
<i>D-ets-6/Ets21C</i>	DA-Basis fusioniert	nein	68%/43%	nein
<i>Ets65A</i>	DA-Basis fusioniert	nein	17%	nein
<i>pnt/D-ets-2</i>	normal	nein	52%/35%	nein
<i>Ets96B, Eip74EF</i>	normal	nein	-	nein

Da die als Kontrollen getesteten *UAS-RNAi*-Konstrukte (*EGFR*, *Raf*, *Ras*) bei Überexpression mit den Treibern *GR1*- und *Traffic jam-Gal4* nicht die erwarteten Phänotypen zeigten, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob der „knock down“ der Ets-verwandten Genen im Follikelepithel wirklich erfolgreich war. An Hand der Ergebnisse konnte daher kein Kandidat, der als Regulator von *pipe* dienen könnte, näher bestimmt werden.

3.4 Weitergehende Charakterisierung des *pipe*-Promotors

Das Repressorelement *Motiv B* ist für die dorsale Repression von *pipe* notwendig. Dessen Deletion führt zur dorsalen Derepression der *pipe*-Transkription. Diese ist aber nicht vollständig uniform. Stattdessen bleibt die *pipe*-Expression in den am weitesten dorsal gelegenen Follikelzellen immer noch reprimiert oder ist zumindest schwächer als im restlichen Follikel epithel (vgl. Abb. 3. 4 und 3. 7). Versuche, in denen das Repressorelement aus seiner ursprünglichen Position im *pipe*-Promotor deletiert und an andere Stellen wieder integriert wurde, deuten darauf hin, dass die Sequenz *Motiv B* allein nicht ausreicht, die dorsale Repression zu vermitteln (vgl. Anhang Abbildung A 6, vgl. (Technau, Knispel et al. 2012)). Daher wurde die essentielle Promotorregion auf die Präsenz weiterer möglicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) sowie auf innerhalb der *Drosophiliden* stark konservierte Sequenzabschnitte durchsucht. Anschließend wurde deren Funktion mit Hilfe von Reporterassays in S2-Zellen und in transgenen Fliegen analysiert.

3.4.1 Promotor-Analyse

Der Sequenzabschnitt von -1135 bis -985 bp relativ zum Transkriptionsstart von *pipe*, der auch das Repressorelement *Motiv B* enthält, ist notwendig und ausreichend, um das *LacZ*-Reporter gen in einem WT-ähnlichen Muster zu exprimieren (Technau, Knispel et al. 2012). Dies wurde in aufwendigen und umfassenden Reporteranalysen nachgewiesen. Daher wurden alle weiteren Promotoranalysen auf diesen Sequenzabschnitt beschränkt. Zuerst wurde mit dem UCSC Genome Browser die Konservierung dieses Sequenzabschnitts innerhalb aller zwölf *Drosophiliden*-Genome dargestellt (siehe Abbildung 3. 10).

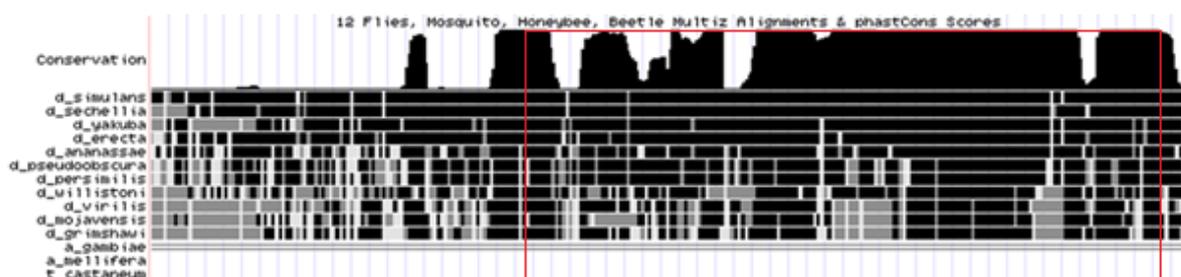


Abbildung 3. 10: Sequenzkonservierung der Promotor-Region des *pipe*-Gens von *Drosophila melanogaster* und elf weiteren *Drosophiliden*. Darstellung des MULTIZ-Alignments des UCSC Genome Browsers einer etwa 300 bp langen Promotor-Sequenz (genomische Lokalisation: chr3L:19,331,568 – 19,331,856). Diese enthält die Basen von -985 bis -1135 bp relativ zum Transkriptionsstart von *pipe* (rote Box) und alle für die WT-ähnliche Reporterexpression notwendigen Elemente. Schwarze Abschnitte innerhalb der graphischen Sequenzdarstellung der einzelnen *Drosophiliden*-Promotoren weisen auf Bereiche starker Konservierung innerhalb des essentiellen Promotors hin, während graue und weiße Schattierungen anzeigen, dass kein Alignment vorliegt. Oberhalb des Alignments gibt ein Plot der PhastCons-Werte (Siepel, Bejerano et al. 2005) den Grad der Konservierung an.

Das multiple Alignment der *pipe*-Promotor-Sequenzen zeigt eine starke Konservierung, die beinahe die gesamte essentielle Promotorregion umfasst (rote Box). Der Grad der Konservierung ist als durchgehender Plot oberhalb des Alignments abgebildet und zeigt über nahezu zwei Drittel der Sequenzlänge hinweg eine hohe Sequenzähnlichkeit aller *Drosophiliden*-Promotoren zu *D. mel* an. Die detaillierte Darstellung des multiplen Alignments mit Hilfe von ClustalW erlaubt die Identifizierung mehrerer hoch konservierter Sequenzabschnitte innerhalb der Promotoren samt zugehöriger Konsensus-Sequenzen (Abbildung 3. 11).

Auf Grund der starken Sequenzkonservierung wurde das *Motiv 2*, welches partiell mit dem bereits bekannten *Motiv B* überlappt, als zusätzliches mögliches Repressorelement identifiziert.



Abbildung 3. 11: Darstellung des multiplen Alignments und potentieller *cis*-regulatorischer Sequenzen durch ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994) mit Unigene Die zu der Promotorsequenz von -1135 bis -985 bp relativ zum Transkriptionsstart in *D. mel* korrespondierenden Promotorbereiche elf weiterer *Drosophiliden* sind in einem multiplen Alignment dargestellt. Darüber sind die Konsensussequenz sowie der Grad der Konservierung angegeben. Die vergrößerten Sequenzausschnitte von *Motiv 2* und *Motiv B* zeigen das Vorhandensein dieser möglichen Repressormotive in allen zwölf *pipe*-Promotoren. Die mit einem blauen Balken unterlegte Sequenz im essentiellen Promotor entspricht dem bereits identifizierten und funktionslosen *Motiv A* (Technau, Knispel et al. 2012). Die mit einem orangen Balken unterlegte Sequenz *Motiv 1* stellt möglicherweise ein weiteres Repressorelement dar, wurde vorerst aber nicht weiter untersucht.

3.4.2 Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Die Repression von *pipe* in dorsalen Follikelzellen resultiert direkt aus der Aktivierung des EGFR-Signalwegs und wird hier durch einen EGFR-aktivierten Transkriptionsfaktor vermittelt. Da für keinen der bekannten EGFR-kontrollierten Transkriptionsfaktoren eine Beteiligung an der Regulation von *pipe* nachgewiesen werden konnte, wurde der konservierte Sequenzabschnitt von -1135 bis -985 bp sowie insbesondere das *Motiv 2* und das *Motiv B* des *pipe*-Promotors erneut mit verschiedenen Programmen auf die Präsenz möglicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) untersucht.

Das Programm PROMO (Messeguer, Escudero et al. 2002; Farre, Roset et al. 2003) identifiziert in der Zielsequenz einer Spezies oder einer Gruppe verschiedener Spezies potentielle TFBS, die in der TRANSFAC-Datenbank gelistet sind (Wingender, Dietze et al. 1996). Das Programm MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) verfährt ähnlich und gleicht ebenfalls die Zielsequenz mit einer ausgewählten TFBS-Bibliothek ab. In beiden Fällen wurden die Anwendungen mit Standard-Parametern durchgeführt (*cut off score* 85). Je nach verwendetem Programm und Parametern wurden mehr oder weniger viele potentielle TFBS innerhalb der essentiellen *pipe*-Promotorregion identifiziert (siehe Abbildung 3. 12 und 3. 13).

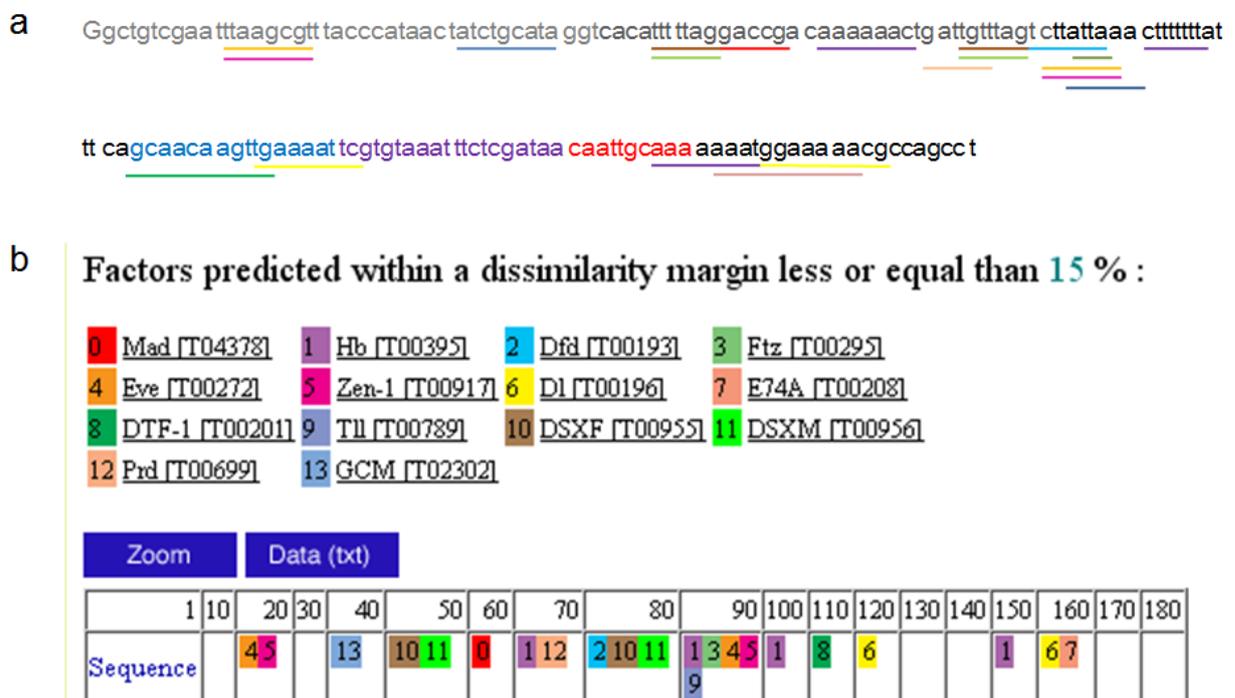


Abbildung 3. 12: Darstellung der PROMO-Resultate (a) Zielsequenz des *pipe*-Promotors (-1135 bis -985 bp); graue Basen umfassen weniger konservierte, schwarze Basen stark konservierte Sequenzabschnitte. Blaue oder rote Basen markieren die Sequenz des *Motiv 2* respektive *Motiv B*, lila zeigt deren gemeinsamen Sequenzabschnitt an. Die farbigen Balken zeigen die Lage der vorhergesagten Motive innerhalb der Zielsequenz. (b) Die Ausgabe der Promo-Resultate zeigt welche Transkriptionsfaktoren wo und wie häufig in der Zielsequenz binden.

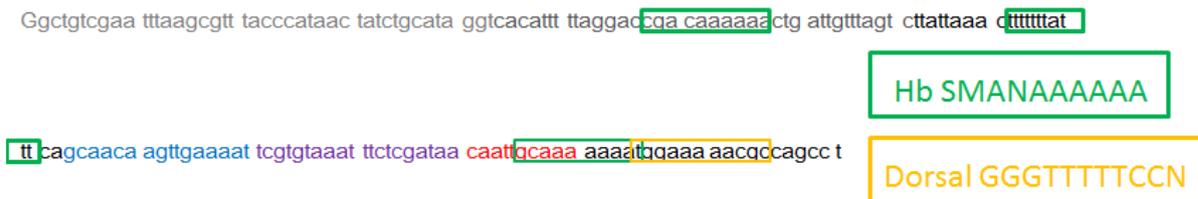


Abbildung 3. 13: Darstellung der Motif Search-Resultate Zielsequenz des *pipe*-Promotors (-1135 bis -985 bp); graue Basen umfassen weniger konservierte, schwarze Basen stark konservierte Sequenzabschnitte. Blaue oder rote Basen markieren die Sequenz des *Motiv 2* respektive *Motiv B*, lila zeigt deren gemeinsamen Sequenzabschnitt an. Die gelbe sowie die drei grünen Boxen zeigen die Lokalisation der potentiellen Bindesequenzen für Hunchback (Hb) und Dorsal (dl).

Im Programm STAMP (Mahony, Auron et al. 2007; Mahony and Benos 2007) wurde zuerst aus den zusammenhängenden Sequenzen des *Motiv B* und *Motiv 2* aller zwölf *Drosophiliden* ein multiples Alignment erstellt. Dieses wurde dann zum Abgleich mit verschiedenen TFBS-Datenbanken verwendet. Von den jeweiligen zehn Top-Kandidaten eines Datenbankabgleichs für potentielle Transkriptionsfaktor-Bindemotive innerhalb des Alignments wurden dann die Konsensussequenzen aufgeführt (Abbildung 3. 14).

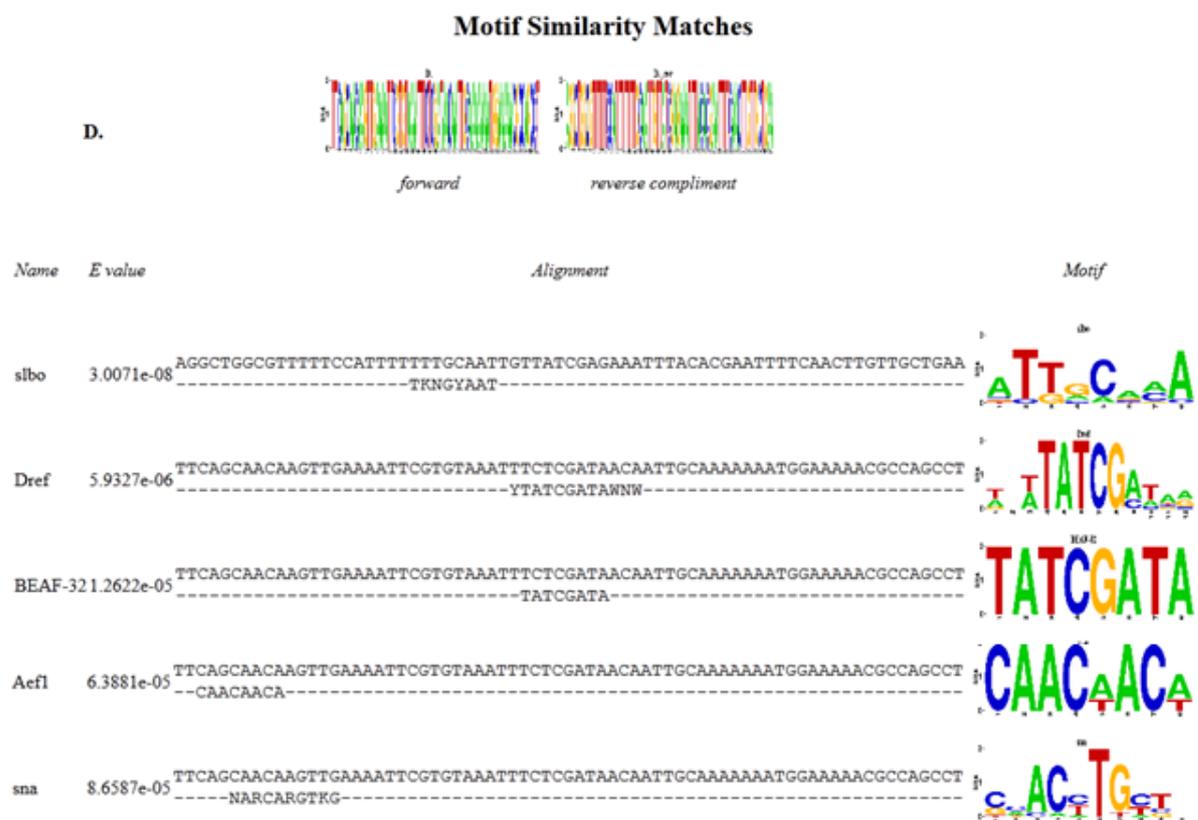


Abbildung 3. 14: Beispiel für die Darstellung der STAMP-Resultate Oben ist die Konsensussequenz des multiplen Alignments der zusammenhängenden Sequenzen *Motiv B* und *Motiv 2* dargestellt. Darunter finden sich die Konsensussequenzen der fünf wahrscheinlichsten TFBS-Kandidaten nach Abgleich mit einer Fliegen-spezifischen TFBS-Datenbank (*Fly(Bergman/Pollard)*) und deren Position innerhalb der Zielsequenz von *D. mel.*

Insgesamt wurden von allen drei verwendeten Programmen 26, nach Herabsetzen des *cut off score* in Motif Search auf 70 sogar 40 verschiedene potentielle Transkriptionsfaktoren, die an den essentiellen Promotorabschnitt von *pipe* binden könnten, vorhergesagt (vgl. Anhang Tabelle A 1).

Hunchback respektive eine TFBS für Hb innerhalb der untersuchten Promotorregion wurde als einziger Kandidat von allen drei Programmen angegeben, die TFBS lag aber nicht innerhalb der konservierten Repressorelemente *Motiv B* oder *Motiv 2*, sondern im besonders A-reichen Abschnitt des *Motiv 1*. Eine von PROMO und Motif Search vorhergesagte TFBS für Dorsal befindet sich außerhalb dieser konservierten Sequenzen. Nur von Motif Search wurde eine weitere *dl*-Bindestelle im *Motiv 2* identifiziert. Da beide Gene - *hunchback* und *dorsal* - während der Oogenese aber nur in Nährzellen exprimiert werden (Steward, McNally et al. 1984; Margolis, Borowsky et al. 1994), wurde deren Beteiligung an der Regulation der *pipe*-Expression ausgeschlossen.

Bei stringenter Anwendung der Standardparameter ergaben sich nur in fünf weiteren Fällen Überschneidungen der Vorhersagen und zwar für *eve*, *zen-1*, *Tll*, *snail* und *Abd-B*. Deren TFBS lagen aber entweder nicht im hochkonservierten Bereich des *pipe*-Promotors oder die Gene wurden in Eikammern nicht exprimiert. Alle weiteren TFBS wurden jeweils nur von einer Datenbank angegeben. Die zugehörigen TF werden nur gering oder gar nicht in Ovarien exprimiert respektive sind nicht speziell im Follikelepithel nachweisbar. Eine repressorische Wirkung der MAPK-regulierten TF Capicua und Tramtrack auf die Expression von *pipe* ist bereits vorher ausgeschlossen worden (Technau, Knispel et al. 2012). Letztlich ergab die Motiv-Suche keine weiteren aussichtsreichen Kandidaten für weitere *in vivo*-Tests. Überraschenderweise wurden auch die inzwischen identifizierten Mirror-Bindestellen, welche im hochkonservierten Bereich des *pipe*-Promotors innerhalb des *Motiv B* und *Motiv 2* liegen und für die dorsale Repression von *pipe* verantwortlich sind, von keinem der verwendeten Programme identifiziert.

3.4.3 Reporterassay in Zellkultur zur Charakterisierung der potentiellen Repressorelemente

Das *Motiv B* und das *Motiv 2* sind in allen *Drosophiliden*-Genomen stark konserviert. Das *Motiv B* ist im endogenen *pipe*-Promotor erwiesenermaßen für die Bindung eines transkriptionellen Repressors notwendig, dies bedeutet aber nicht, dass es diese Funktion auch außerhalb seines normalen Sequenzkontexts ausüben kann.

Um zu testen, ob dieses konservierte Sequenzelement auch ausreichend ist außerhalb des endogenen Promotors einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren zu binden und somit die Repression eines Genes zu vermitteln, wurde das *Motiv B* in den *Actin5C*-Promotor integriert

und die Expression eines GFP-Reportergens in Schneider 2-Zellkulturen analysiert. Zusätzlich zu *Motiv B* wurde auch das konservierte Element *Motiv 2* auf seine möglichen repressorischen Eigenschaften untersucht. Die Integration der potentiellen Repressorelemente in den *Actin5C*-Promotor erfolgte an eine Position, die bezüglich der Entfernung zum Transkriptionsstart deren ursprünglicher Position im endogenen *pipe*-Promotor entsprach. Zur Feststellung der basalen Promotoraktivität wurde GFP unter Kontrolle des unveränderten *Actin5C*-Promotors in S2-Zellen exprimiert. Alle Zellen wurden neben dem Reportervektor zusätzlich mit einem Normalisierungsvektor (pAc5.1::LacZ) kotransfiziert. Die GFP- und β Gal-Expression in den jeweils transient transfizierten Zelllinien wurde mit Hilfe von Antikörperfärbungen visualisiert (Abbildung 3. 15).

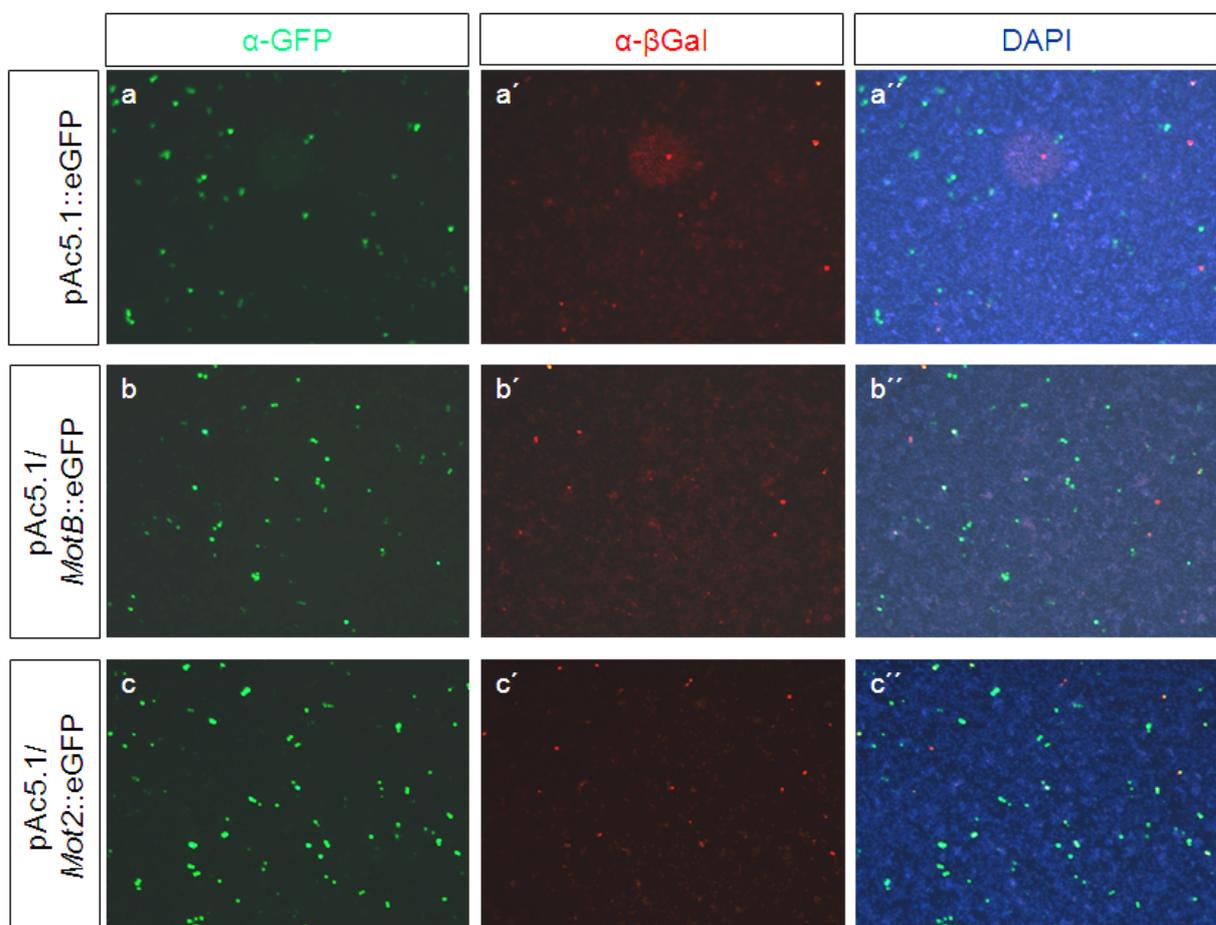


Abbildung 3. 15: Beispiel für die Expression der Reporterkonstrukte in S2-Zellen anti-GFP und anti- β Gal Antikörperfärbung an fixierten Schneider 2-Zellen nach Kotransfektion mit pAc5.1::LacZ als Normalisierungsvektor und den Reportervektoren pAc5.1::eGFP (a), pAc5.1/*MotB*::eGFP (b) oder pAc5.1/*Mot2*::eGFP (c).

Die Integration der Repressorelemente *Motiv B* oder *Motiv 2* in den *Actin5C*-Promotor führte im Vergleich zur Kontrolle zu keiner quantitativen Abnahme EGFP-exprimierender S2-Zellen (Abbildung 3. 15). Alle Transfektionen wurden für jedes Reporterkonstrukt in dreifacher Ausführung an jeweils vier unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Insgesamt konnte durch

die Integration der Repressorelemente keine signifikante Veränderung der GFP-Expression erreicht werden (Abbildung 3. 16).

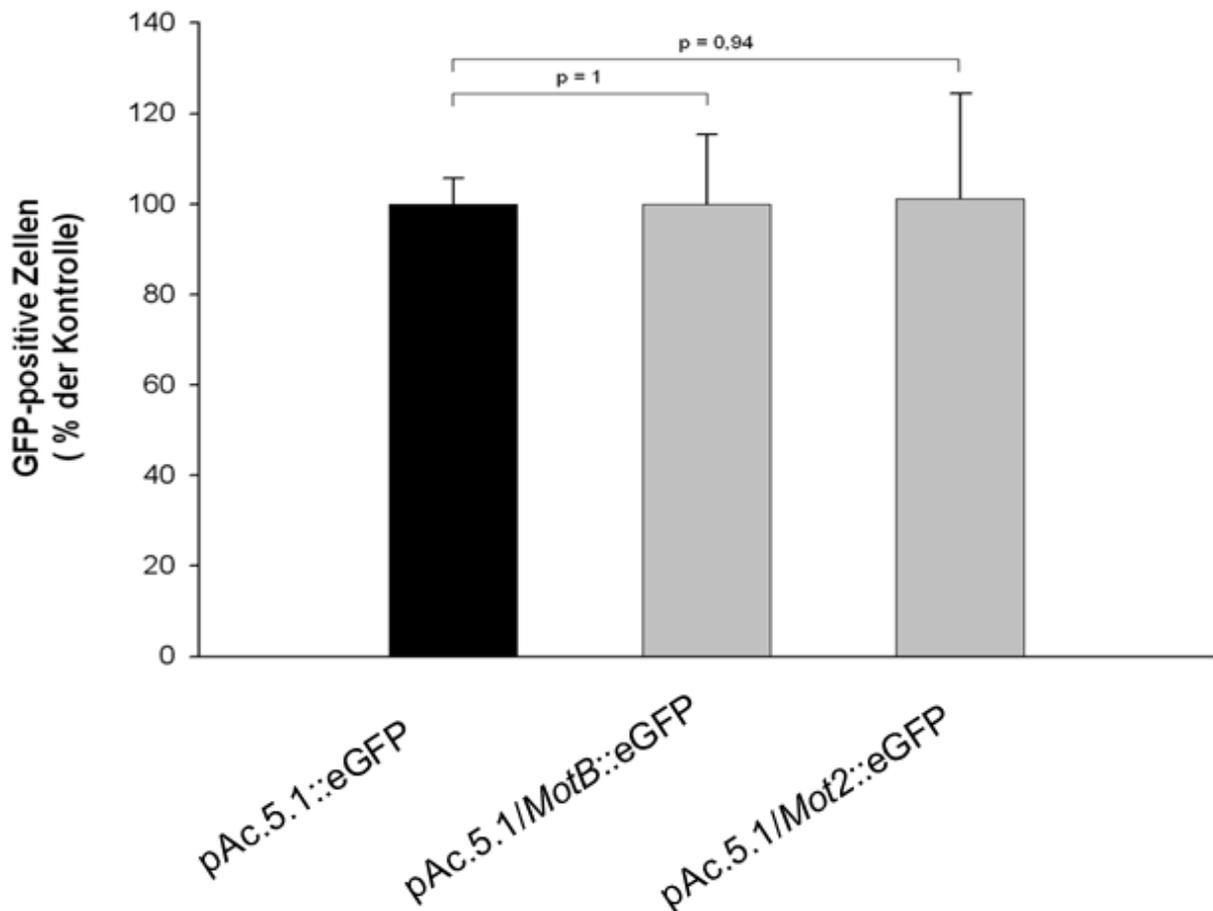


Abbildung 3. 16: EGFP-Expression in S2-Zellen Expression des Reportergens eGFP unter Kontrolle verschiedener Promotorkonstrukte (pAc5.1/*MotB*::eGFP; pAc5.1/*Mot2*::eGFP) in S2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (pAc5.1::eGFP). Dargestellt sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung vom Mittelwert (n = 4).

Neben der Zählung GFP-exprimierender Zellen wurden die Proteinextrakte der verschiedenen Zelllinien mittels Western-Blot aufgetrennt und das Verhältnis der EGFP- zur β -Galactosidase-Proteinexpression mit Hilfe der ImageJ Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) densitometrisch abgeschätzt (<http://howtowesternblot.net/data-analysis-3/quantification/>) (Abbildung 3. 17). Die Menge des gebildeten Proteins in den einzelnen Zelllinien wird durch die Präsenz der Repressorbindestellen *Motiv 2* und *Motiv B* nicht vermindert.

Der Western Blot und die anschließende Quantifizierung wurden zwar nur ein einziges Mal durchgeführt, trotzdem decken sich die Ergebnisse mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen, dass die Integration der Repressorelemente allein wahrscheinlich nicht ausreicht, die Repression des GFP-Reportergens zu vermitteln.

Die Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen werden auch durch die zuvor durchgeführten *in vivo*-Untersuchungen bestätigt. Nach Verschiebung des Repressorelements *Motiv B* an die

Positionen -1 oder -1500 bp im *pipe*-Promotor relativ zum Transkriptionsstart war dieses nicht mehr in der Lage die Repression des *LacZ*-Reportergens in dorsalen Follikelzellen zu vermitteln (vgl. Anhang Abbildung A 6; vgl. (Technau, Knispel et al. 2012)).

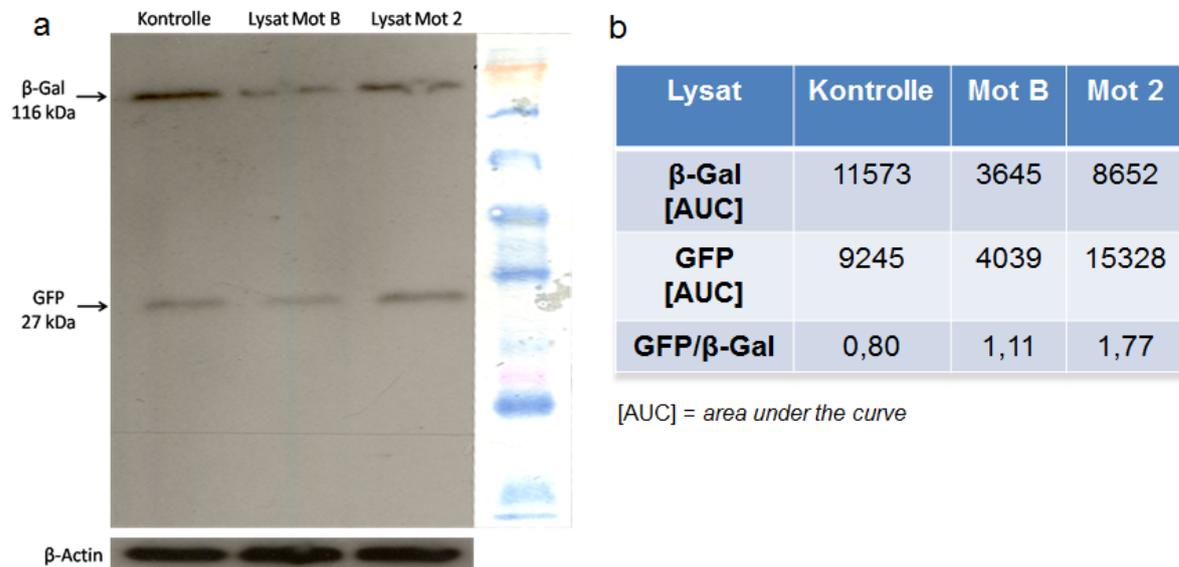


Abbildung 3. 17: Western Blot und densitometrische Abschätzung zum Vergleich der GFP-Expression in S2-Zellen (a) Proteinlysate der S2-Zellen, die mit den Reporterkonstrukten pAc5.1::eGFP (Kontrolle), pAc5.1/*MotB*::eGFP (Lysat Mot B) oder pAc5.1/*Mot2*::eGFP (Lysat Mot 2) sowie jeweils dem Normalisierungsvektor pAc5.1::*LacZ* transfiziert waren, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. β-Galactosidase (116 kDa) und GFP (27 kDa) wurden mittels monoklonalen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurde β-Actin verwendet. (b) Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Western Blot-Banden mit dem Programm ImageJ und relative Quantifizierung der GFP-Proteinexpression.

3.4.4 Funktionelle Charakterisierung des erweiterten Repressorelements *in vivo*

Da sowohl die Deletion des Repressorelements *Motiv B* nicht zu einer uniformen Derepression von *pipe* im Follikelepithel führt als auch die Integration von *Motiv B* oder *Motiv 2* in einen fremden Sequenzkontext jeweils allein nicht ausreicht, um die Repression eines Genes zu vermitteln, wurde der 69 bp lange Sequenzabschnitt, der beide Motive umfasst aus dem endogenen *pipe*-Promotor deletiert (1,6Δ69) und anschließend die Expression des EGFP-Pipe-Fusionskonstrukts im Follikelepithel visualisiert (siehe Abbildung 3. 18).

Unter Kontrolle des 1,6Δ69-Promotors weitet sich die Expression des Reporterproteins wie auch in Ovarien der transgenen 1,6Δ*B*::EGFP-Pipe Fliegen bis in dorsale Follikelzellen aus, wobei aber das Signal im dorsalen Teil der Eikammer immer noch schwächer ist als im ventralen Teil (b, b'). Gleiches gilt auch für die Verteilung der mRNA (a, a'). Somit führt auch die Deletion eines erweiterten Sequenzabschnitts nicht zur uniformen Derepression von *pipe*.

Erst kürzlich identifizierten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander den Repressor Mirror (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012) als Faktor für die dorsale Repression. Mehrere im *Motiv 69* liegende Iroquois-Bindestellen (*IBS*) vermitteln die Bindung von Mirror an den *pipe*-Promotor. Die Untersuchungen in Zellkultur sowie mit transgenen Fliegen zeigen aber auch, dass diese (*IBS*-) Sequenzen allein nicht ausreichen. Entweder befinden sich noch weitere Iroquois-Bindestellen im *pipe*-Promotor oder ein bislang noch nicht identifizierter Transkriptionsfaktor ist zusätzlich an der Regulation von *pipe* beteiligt.

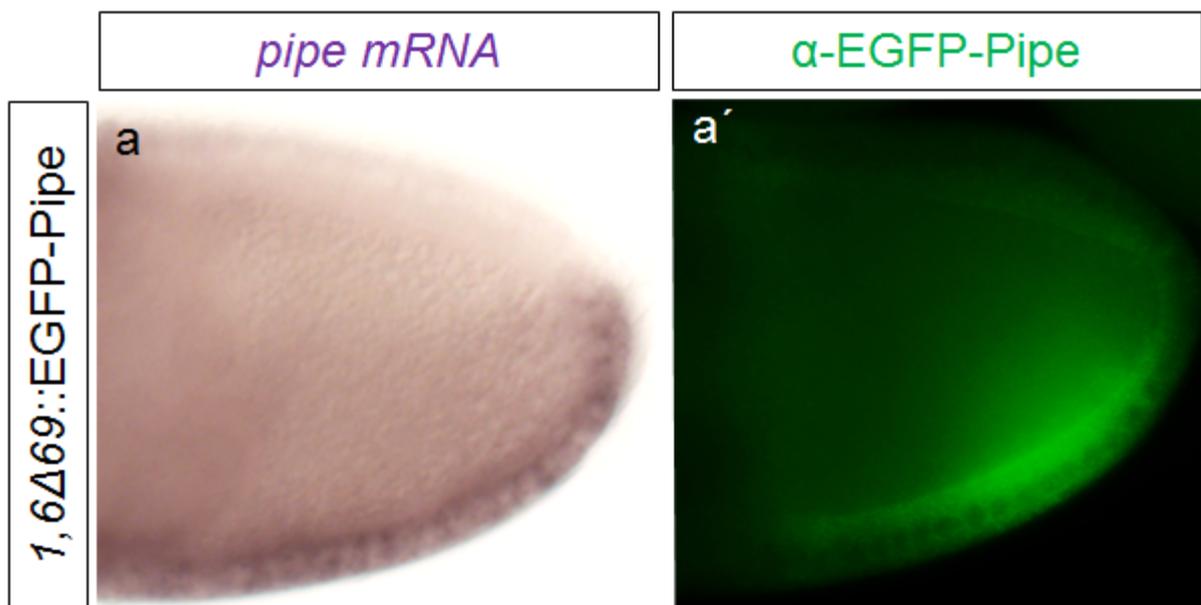


Abbildung 3. 18: Expression des EGFP-Pipe-Fusionsproteins unter Kontrolle des intern deletierten Promotors (a-a´) Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10 A, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a) *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der endogenen *pipe*- und *eGFP-pipe* mRNA-Expression unter Kontrolle des *1,6Δ69*-Promotors. (a´) anti-GFP Antikörperfärbung zur Visualisierung der Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des intakten des *1,6Δ69*- Promotors.

3.5 Einfluss der *pipe*-Expression auf die embryonale Musterbildung

Die Bildung der embryonalen dorsoventralen Achse hängt von der vorher gehenden Etablierung dieser Achse im Ovar ab. Für die Übertragung der Polarität von den Follikelzellen auf den späteren Embryo ist die Expression von *pipe* notwendig. *pipe* wird in einer ventralen Domäne, die 40% des Eikammer-Umfangs umfasst, uniform exprimiert. Korrespondierend zu dieser Region wird im späteren Embryo innerhalb dieser Domäne, die a noch 40% der dorsoventralen Achse entspricht, der Glocken-förmige Dorsal-Gradient etabliert. Zwar ist durch die ektopische Expression in dorsalen Follikelzellen bereits gezeigt worden, dass *pipe* allein in der Lage ist eine dorsoventrale Achse, hier nun mit invertierter

Polarität zu initiieren. Es ist aber nicht bekannt, ob durch die Position der *pipe*-Expressionsdomäne nur eine anfängliche Asymmetrie etabliert wird oder ob diese den Rahmen, in welchem die folgenden Musterbildungsprozesse ablaufen, festlegt. Hinweise auf letztere Hypothese geben *grk*- oder *egfr*-Mutanten, in denen sich die endogene *pipe*-Domäne in laterale Regionen des Follikelepithels ausweitet. In Folge dessen wird der Dorsal-Gradient nicht nur breiter; in einigen Fällen spaltet sich das ventrale Maximum des intranukleären Transkriptionsfaktors auch in zwei Maxima auf, die nun die ventrale Mittellinie flankieren. Diese Duplikation der embryonalen Achse kann möglicherweise durch die unterschiedlichen Eigenschaften der im Perivitellinspalt generierten Spätzle-Produkte erklärt werden (vgl. Abb. 1. 7). Diese Beobachtungen, schließen aber nicht aus, dass auch schon kleine Expressionsdomänen eine Asymmetrie im Follikelepithel induzieren könnten, welche für die Initiierung der dorsoventralen Musterbildung ausreichend ist.

Welche Prozesse im Perivitellinspalt der Bildung des Dorsal-Gradienten zu Grunde liegen, ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Zwar ist mit dem C-terminalen Spätzle-Fragment der Ligand des Toll-Rezeptors im Embryo bekannt, wie und ob dessen graduelle Verteilung, welche die Bildung des Dorsal-Gradient im Embryo auslöst, durch *pipe* etabliert und eventuell stabilisiert wird, ist jedoch noch ungeklärt. Möglicherweise erfolgt in der ventralen *pipe*-Domäne nicht nur die Bildung eines Aktivators des Toll-Signalwegs, sondern zusätzlich eines Inhibitors. Laterale Inhibition führt dann zur ventralen Stabilisierung des Spätzle-respektive Dorsal-Gradienten und bietet auch eine Erklärung für die Achsenduplikation.

Um die Rolle von *pipe* als Verbindungselement zwischen Ovar und Embryo zu untersuchen, wurde die endogene Expression mit unterschiedlichen Methoden manipuliert und die Auswirkung dieser veränderten Expression auf die Musterbildung im Embryo visualisiert.

3.5.1 Uniforme Expression von *pipe* führt zur partiellen Lateralisierung

Da *pipe* erwiesenermaßen für die Induktion des ventralen Pols der DV-Achse im Embryo benötigt wird, wurde untersucht, ob die vollkommen symmetrische Expression von *pipe* zu einer kompletten Ventralisierung des Embryos führt oder ob eine Asymmetrie und somit eine dorsoventrale Polarität im Embryo etabliert wird. Hierzu wurde *pipe* im gesamten Follikelepithel mit Hilfe der *Cy2-Gal4*-Treiberlinie in Fliegen mit einem *pipe*-negativen Hintergrund (*UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴/UASpip^{ST2}pip^{C14}*) uniform exprimiert. Die Auswirkungen auf die Initiierung der dorsoventralen Achse sowie auf deren Polarität wurden durch Kutikulapräparationen visualisiert (Abbildung 3. 19).

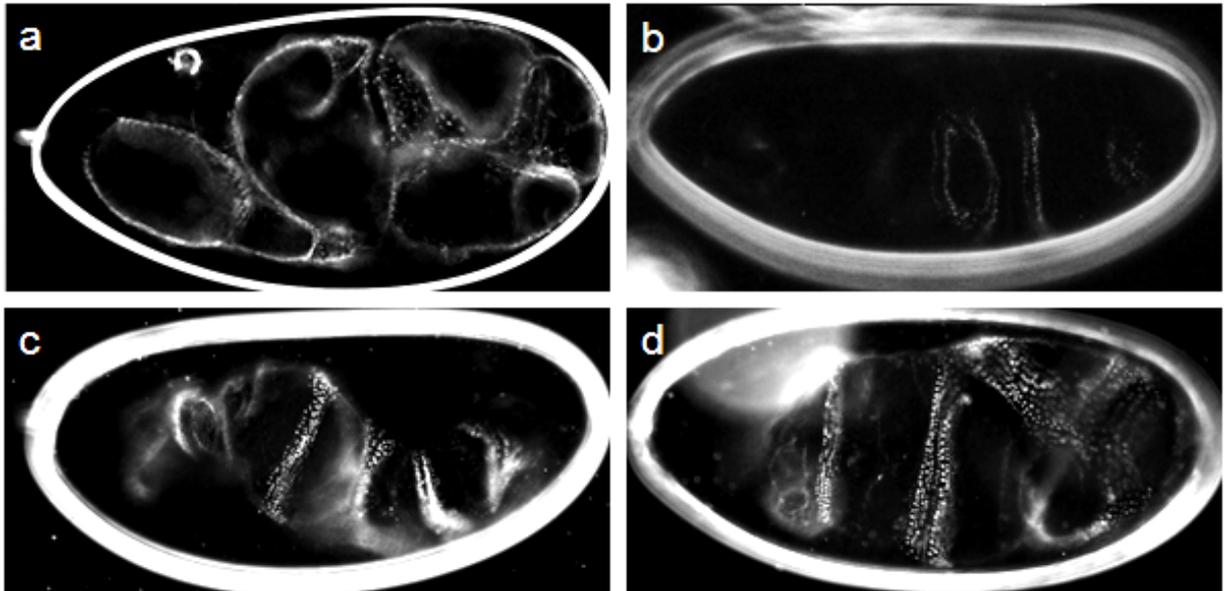


Abbildung 3.19: Auswirkung fehlender *pipe*-Expression sowie der uniformen *pipe*-Überexpression auf die dorsoventrale Achse des Embryos (a,d) Kutikulapräparate von Embryonen, die mit dem anterioren Pol nach links orientiert sind. (a) Dorsalisierter Kutikulaphänotyp des Embryos eines *pipe* mutanten Weibchens; der Embryo bildet einen Schlauch aus dorsalisiertem Gewebe, das durch Vorhandensein der feinen Härchen gekennzeichnet ist. (b-d) Kutikulaphänotypen der Embryonen von *pipe* mutanten Weibchen, in deren Follikelepithel *pipe* bei 18°C (b), 25°C (c) oder 29°C (d) uniform überexprimiert wurde. Mit ansteigender Temperatur erhöht sich der Anteil von lateralem Gewebe, das durch das Vorhandensein ventraler Zähnchenbänder gekennzeichnet ist.

Die uniforme Expression von *pipe* resultiert in einer Lateralisierung des späteren Embryos, die durch die Ausdehnung der ventralen Zähnchenbänder in den Kutikulas sichtbar wird. Während die uniforme Expression von *pipe* bei 18°C nur posterior zu einer Initiierung lateraler Strukturen führt, umgeben diese bei höheren Temperaturen und verstärkter *pipe*-Expression, beinahe den gesamten Embryo entlang der anteriorposterioren Achse.

3.5.2 Uniforme Expression von *pipe* führt zum Verlust der Bilateralsymmetrie

Um die fast vollständige Lateralisierung der Embryonen zu verifizieren und zudem die Identität des nicht mit Zähnchenbändern besetzten Gewebes zu klären, wurden *in-situ*-Hybridisierungen mit Sonden gegen verschiedene Dorsal-Zielgene in den entsprechenden Embryonen durchgeführt (Abbildung 3. 20).

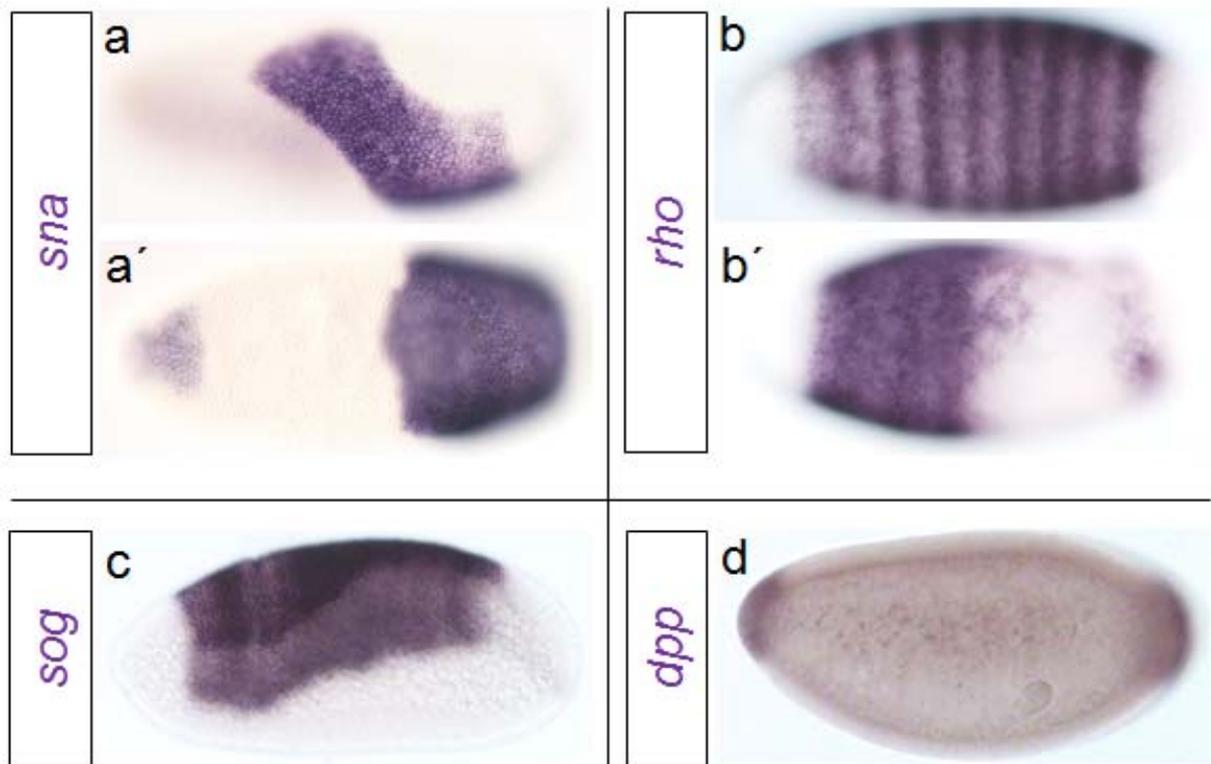


Abbildung 3. 20: Expression verschiedener Dorsal-Zielgene in Embryonen nach uniformer Überexpression von *pipe* im Follikelepithel (a-d) *In-situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-gekoppelten Sonden zur Visualisierung der Expression verschiedener Dorsal-Zielgene in Embryonen von *Cy-Gal4;UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴/UASpip^{ST2}pip^{C14}*-Müttern. (a,a') mRNA-Expression des ventralen Markergens *snail*, (b,b') des lateralen Markergens *rhomboïd*, (c) des lateralen Markergens *short gastrulation* sowie (d) des dorsalen Markergens *decapentaplegic*.

Überraschenderweise ist die erwartete uniforme Lateralisierung des Embryos, reflektiert durch die ringförmige Expression von *rhomboïd* (Abbildung 3. 20 b), nur in wenigen Fällen zu beobachten. In den meisten Fällen ist noch immer eine dorsoventrale Asymmetrie zu erkennen, wobei aber die bilaterale Symmetrie entlang der AP-Achse aufgehoben ist. Die Embryonen weisen häufig eine nach lateral erweiterte *snail*-Domäne auf; dies bleibt aber meist auf die posteriore Hälfte der AP-Achse beschränkt (Abbildung 3. 20 a,a'). Die Expression von *rho* (b') oder *sog* (c) zeigt die Lateralisierung der Embryonen besonders anterior und dorsal an. Der vollständige Verlust dorsalen Gewebes führt zum Verschwinden der *decapentaplegic*-Expression entlang des Eiumfangs; nur an den Polen wird *dpp* durch Einflüsse des Terminalsystems induziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Etablierung einer dorsoventralen Achse entweder keine durch *pipe* generierte Asymmetrie notwendig ist oder durch die verwendeten Treiberlinien trotz allem eine asymmetrische Verteilung der *pipe*-Aktivität generiert wird. Möglicherweise reichen schon geringste Expressionsunterschiede für die Induktion einer dorsoventralen Polarität aus.

3.5.3 Analyse der Treiberlinienexpression

Zur Visualisierung der *pipe*-Expression unter der Kontrolle des verwendeten uniformen *Cy2-Gal4*-Treibers sowie des noch stärker und früher aktiven *Traffic jam-Gal4*-Treibers, wurde eine *in-situ*-Hybridisierung mit einer *pipe*-Sonde in Ovarien durchgeführt. Um die zwei Extreme der *pipe*-Expressionslevel zu zeigen – sehr schwache im Gegensatz zur sehr starken Überexpression von *pipe* – wurde die Expression mit *Cy2-Gal4* bei 18°C sowie 29°C und mit *Traffic jam-Gal4* bei 18°C sowie 29°C visualisiert (Abbildung 3. 21).

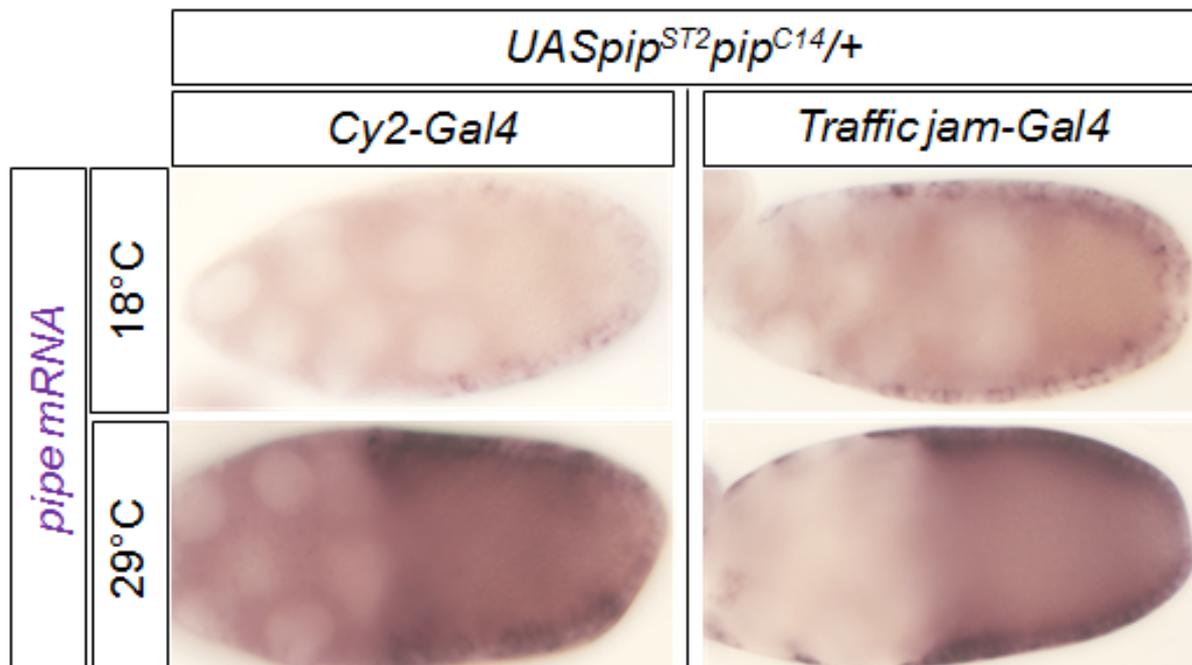


Abbildung 3. 21: *pipe*-Expression im Follikelepithel unter Kontrolle zweier uniform aktiver Treiberlinien Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10 A, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde zur Visualisierung der *pipe*-mRNA-Expression bei Verwendung verschiedener *Gal4*-Treiberlinien bei 18°C und 29°C. Die *pipe*-Expression ist abhängig von der Treiberlinie und der Temperatur schwach und unregelmäßig bis sehr stark und uniform im gesamten Follikelepithel nachweisbar.

Die Verwendung der *Cy2-Gal4*-Linie bei niedrigen Temperaturen zur uniformen Expression ermöglicht nur eine schwache und unregelmäßige Expression von *pipe*. Dies könnte als Erklärung für die beobachtete dorsoventrale Polarität in den Nachkommen herangezogen werden, die möglicherweise schon durch eine geringe (temporäre) Asymmetrie initiiert werden kann. Bei 29°C ist die Expression etwas stärker und uniformer. Im Gegensatz zur etwas schwächeren *Cy2-Gal4*-Treiberlinie ermöglicht die *Traffic jam-Gal4*-Linie schon bei 18°C eine regelmäßige und bei 29°C eine sehr starke uniforme Expression von *pipe* im Follikelepithel. Der *Traffic jam-Gal4*-Treiber ermöglicht zudem eine zwei- bis dreimal stärkere Expression des UAS-Konstrukts, als der *Cy2-Gal4*-Treiber (vgl. Anhang Abbildung A 7).

3.5.4 Etablierung einer *in-situ*-Hybridisierung zur simultanen Analyse der Dorsal-Zielgene *snail* und *rhomboid*

Die Überexpression von *pipe* im Follikel­epithel führt zu einer solch starken Veränderung der Expressionsmuster der Dorsal-Zielgene, dass an Hand deren einzelner Expressionsmuster die Polarität der DV-Achse nicht mehr eindeutig feststellbar ist. Daher werden für weitere Analysen des Einflusses von *pipe* auf die embryonale Musterbildung die direkten Zielgene *sna* und *rho* simultan detektiert. Abbildung 3. 22 zeigt deren Expressionsdomänen im WT im Laufe der Embryonalentwicklung.

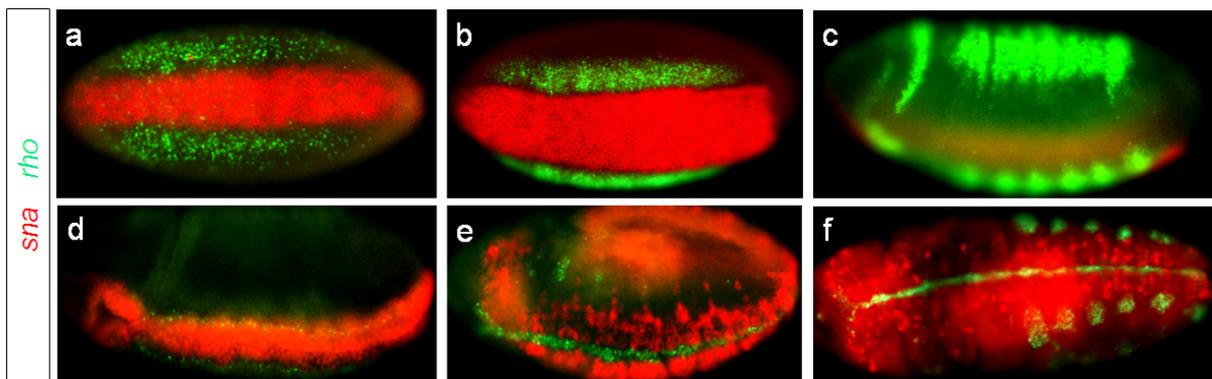


Abbildung 3. 22: Expression der Dorsal-Zielgene *snail* und *rhomboid* während verschiedener Stadien der Embryogenese (a-f) *In-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der Dorsal-Zielgene *snail* (rot) und *rhomboid* (grün) in WT-Embryonen. (a) Ventralansicht eines Embryos im Stadium 4; *snail* wird in einem durchgehenden ventralen Streifen entlang der AP-Achse des Embryos exprimiert und beidseitig lateral von *rhomboid* flankiert. (b) Ventralansicht eines Embryos in Stadium 5; *snail* wird in den ventralsten 20% des Embryos in einem scharf begrenzten Streifen exprimiert und an den terminalen Polen reprimiert. Die flankierende *rho*-Expression beginnt sich zu segmentalen Abschnitten zu verdichten. (c) Lateralansicht eines Embryos im Stadium 6; *rho*-Expression ist auch im dorsalen Ektoderm nachweisbar. (d) Ventro-lateralansicht eines Embryos während der Gastrulation in Stadium 7. *snail*-exprimierende Zellen invaginieren mit Bildung der Ventralfurche. (e) Ventro-lateralansicht eines Embryos im Stadium 9-10; nach der Keimstreif-Ausstreckung verschwindet die *sna*-Expression im Mesoderm; *snail*-Transkripte sind jetzt im ventralen und neurogenen Ektoderm nachweisbar. *rho* wird entlang der ventralen Mittellinie im Mesektoderm exprimiert. (f) Ventralansicht eines Embryos im Stadium 11-12; *rho* wird entlang der ventralen Mittellinie im Mesektoderm und im kardialen Mesoderm exprimiert.

3.5.5 Asymmetrische *pipe*-Expression ist nicht notwendig für die Initiierung der DV-Achsenpolarität

Um zu Überprüfen, wie sich die unterschiedlichen Expressionsstärken der Treiberlinien und die Ausdehnung der *pipe*-Expressionsdomäne auf die embryonale Musterbildung auswirken, wurde *pipe* bei verschiedenen Temperaturen mit dem *Cy2-Gal4*- oder *Traffic jam-Gal4*-Treiber in *pipe* negativen wie auch WT-Weibchen exprimiert. Durch den Vergleich der *sna*- und *rho*-Expressionsmuster in Nachkommen von Weibchen mit bestehender asymmetrischer *pipe*-Expression (*UASpip^{ST2}pip^{w^e}/+*) (Abbildung 3. 23 und 3. 26) sowie möglicherweise zufällig

generierter Asymmetrie ($UASpip^{ST2}pip^{684}/UASpip^{ST2}pip^{C14-}$) (Abbildung 3. 25 und 3. 27) kann darauf geschlossen werden, ob die beobachtet Polarität nach uniformer Überexpression von *pipe* durch Unregelmäßigkeiten in der Treiberlinien-Aktivität oder einem endogenen „ventralisierenden Faktor“ verursacht wird.

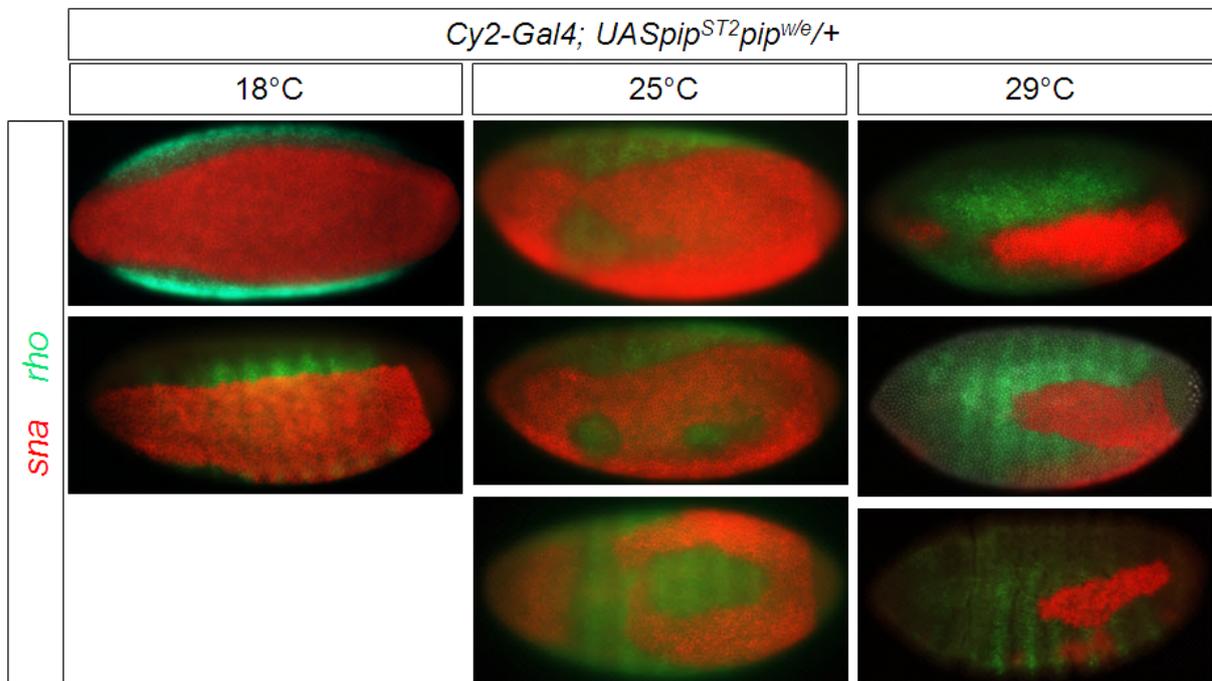


Abbildung 3. 23: Expression der Dorsal-Zielgene *snail* und *rhuboid* in Embryonen nach uniformer Überexpression von *pipe* im Follikelepithel von WT-Weibchen *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der Dorsal-Zielgene in Embryonen von $Cy-Gal4;UASpip^{ST2}pip^{w/e/+}$ -Müttern. Bei 18°C wird *snail* ventral und *rho* lateral in einem WT-ähnlichen Muster exprimiert. Bei höheren Temperaturen verbreitert sich die *snail*-Domäne entlang der gesamten AP-Achse oder spaltet sich - anterior beginnend - entlang der ventralen Mittellinie auf. *rho* wird hier in allen verbleibenden Zellen, in den keine *sna* mRNA nachweisbar ist, exprimiert.

Die Expression von *pipe* mit Hilfe des *Cy2-Gal4*-Treibers im WT-Hintergrund bedingt eine zwar unregelmäßige aber schwache Expression von *pipe* im gesamten Follikelepithel, welche die endogene ventrale Expressionsdomäne überlagert. Trotz uniformer *pipe*-Expression verbleibt eine Asymmetrie bezüglich der Präsenz von Pipe sowie der EZM-Modifikationen im Perivitellinspalt. Die eindeutig ventral lokalisierten Expressionsdomänen von *snail* unter allen Temperaturbedingungen zeigen, dass die uniforme Präsenz von *pipe* zwar die Region, in welcher die embryonalen Musterbildungsprozesse ablaufen, vergrößert, diese aber auf Grund der bestehenden Asymmetrie stets ventral initiiert werden. Die geringe Verstärkung der WT-Domäne von *pipe* führt in einigen Fällen zu einer leichten lateralen Expansion der *snail*-Expression im Embryo; *rho* wird in einem WT-ähnlichen Muster exprimiert (Abbildung 3. 23). Bei höherem Temperaturen und einer starken Erhöhung der *pipe*-Expression im ventralen Teil expandiert die *snail*-Expression stark nach lateral und umgibt nun mehr als 50% der dorsoventralen Achse, während *rho* in allen verbleibenden

sna-negativen Zellen exprimiert wird. In vielen Fällen kommt es auch zu einer Aufspaltung der Achse. Ähnliche Phänotypen können in Nachkommen von *grk*- und *egfr*-Weibchen mit einer expandierten *pipe*-Domäne oder in Embryonen, in denen die Konzentration von Spätzle durch mRNA-Injektion erhöht wurde, beobachtet werden.

Die Expansion ventraler und lateraler Schicksale wird auch durch die Verteilung von Dorsal reflektiert (Abbildung 3. 24).

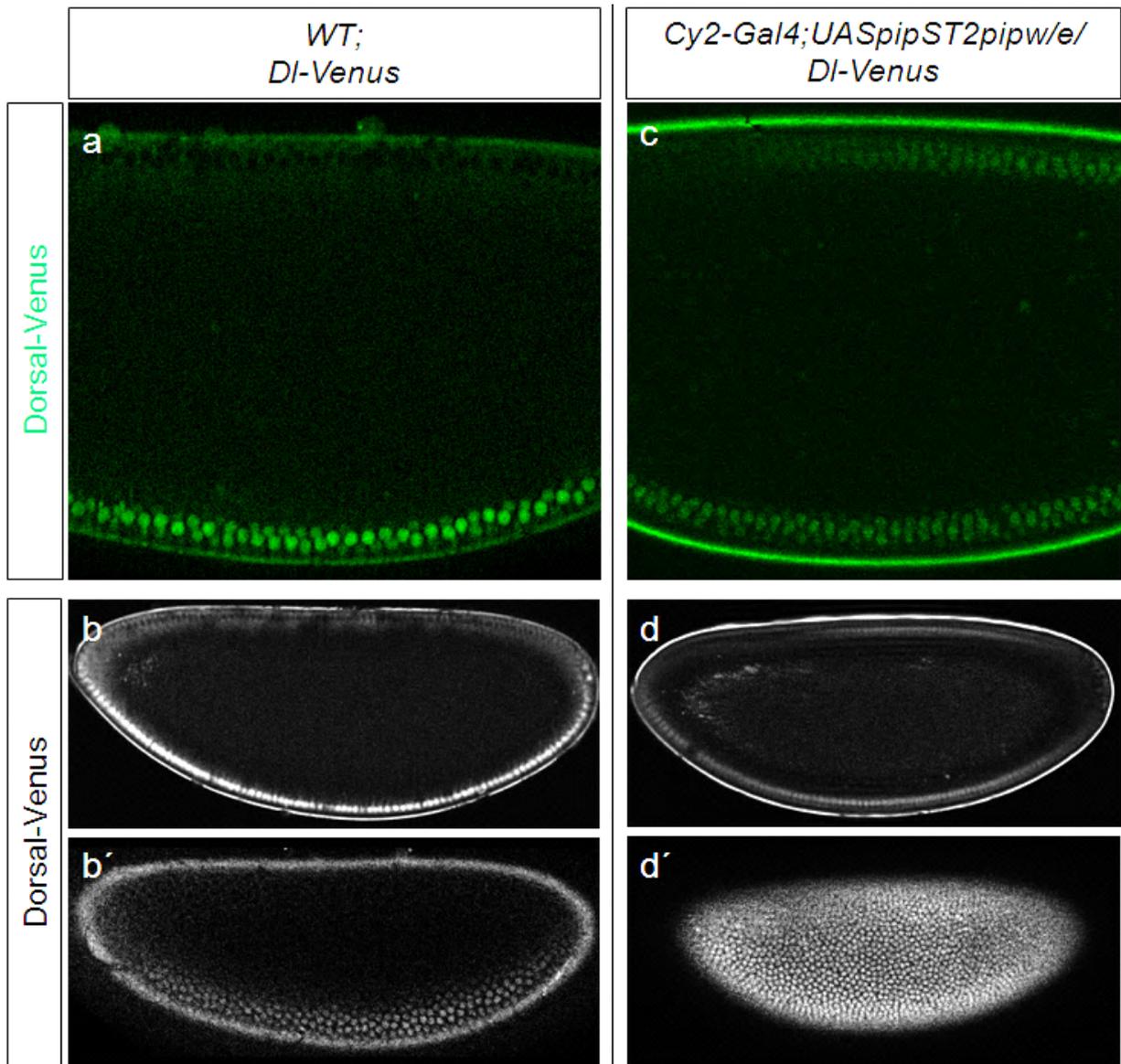


Abbildung 3. 24: Verteilung von intranukleärem Dorsal in WT-Embryonen und in Embryonen nach uniformer Überexpression von *pipe* im Follikelepithel (a-d') Lateralansicht von Embryonen, die mit dem anterioren Pol nach rechts und der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. (a-b') Dorsal-Venus liegt in ventralen Kernen in einer hohen Konzentration vor, in dorsalen Kernen ist es nicht nachweisbar. (c-d') Dorsal-Venus liegt in beinahe allen Kernen, besonders aber in der posterioren Hälfte des Embryos, in einer intermediären Konzentration vor.

Überraschenderweise führt die Expression von *pipe* mit Hilfe des *Cy2-Gal4*-Treibers in Fliegen mit *pip*⁻-Hintergrund zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 3. 25). Auch in deren Nachkommen werden *snail* und *rhomboid* asymmetrisch exprimiert.

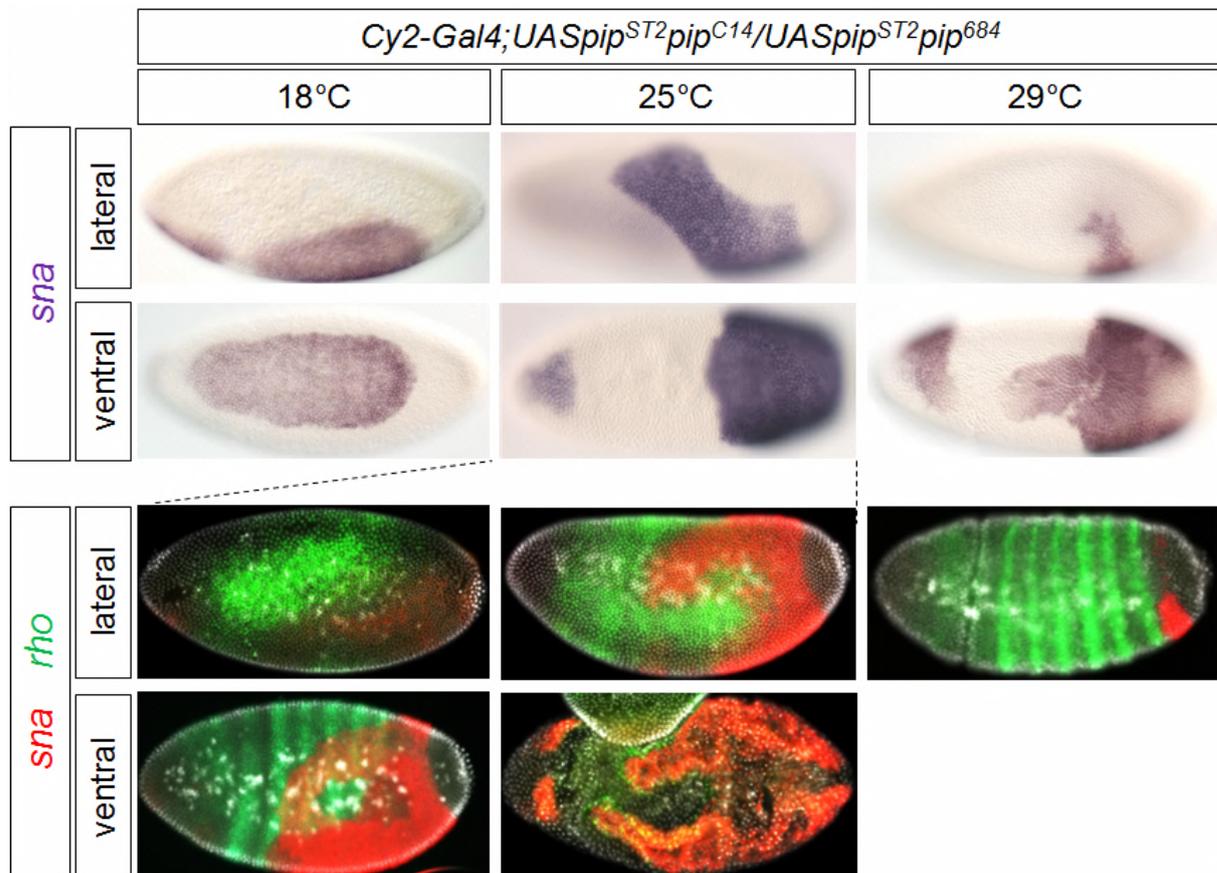


Abbildung 3. 25: Expression der Dorsal-Zielgene *snail* und *rhomboid* in Embryonen nach uniformer Überexpression von *pipe* im Follikelepithel *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der Dorsal-Zielgene in Embryonen von *Cy-Gal4;UAS*pip*^{ST2}*pip*⁶⁸⁴/UAS*pip*^{ST2}*pip*^{C14}*-Müttern. Bei 18°C wird *snail* in einem beinahe WT-ähnlichen Muster ventral exprimiert. Bei höheren Temperaturen werden die anteriore Expression und die bilaterale Symmetrie der *snail*-Expression aufgehoben. Die Expression von *rho* expandiert entlang der AP-Achse nach dorsal.

Obwohl die Expression von *pipe* unter Kontrolle des *Cy2-Gal4*-Treibers nicht immer uniform erfolgt, sollten die entstandenen Expressions-Asymmetrie keinen Regeln folgen sondern zufällig etabliert werden. Trotzdem ist unter verschiedenen Temperaturbedingungen in allen Embryonen eine eindeutige Polarität der dorsoventralen Achse erkennbar, wobei ventrale Identitäten stets auch in der, an der Eiform erkennbar, ventralen Region spezifiziert werden. Bei 18°C wird *snail* in einem Muster exprimiert, das innerhalb der WT-Expressionsdomäne liegt. Zwar sind die Grenzen zwischen mesodermalem und lateralem Gewebe sowie an den Termini nicht mehr so scharf wie im Wildtyp oder in Nachkommen von *Cy2-Gal4; UAS*pip*^{ST2}*pip*^{w/e}/+*-Fliegen, die Embryonen besitzen aber eindeutig eine asymmetrische dorsoventrale Achse. Auch die Expansion der *snail*-Expression und die spätere Aufspaltung in zwei laterale Domänen erfolgt stets ventral oder lateral und kann niemals auf der dorsalen

Seite beobachtet werden. Auch die bilaterale Symmetrie der *snail*-Expression ist aufgehoben, da keine Stabilisierung der Muster durch die scharfen Grenzen der endogenen *pipe*-Expression gewährleistet wird.

Sehr auffällig ist, dass in Nachkommen von *Cy2-Gal4;UASpip^{ST2}pip^{C14}/UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴*- wie auch in *Cy2-Gal4;UASpip^{ST2}pip^{w/e}/+*-Fliegen die Expression von *rhomboid* nicht mehr in zwei lateralen Streifen erfolgt. Stattdessen expandiert dessen Expression nach dorsal und teilweise auch nach ventral, wo es zu einer Fusion der getrennten Domänen kommt. Oft ist daher eine ringförmige Expression in sieben segmentalen Streifen erkennbar, die höchsten lokal von *snail*-exprimierenden Zellen unterbrochen wird. In keinem Falle ist aber eine gleichzeitige Expression von *rho* und *sna* in einer Zelle zu beobachten. Die uniforme *rho*-Expansion ist eindeutig auf die Expansion der lateralen Domäne zurück zu führen; die Expansion der dorsalen Expressionsdomäne kann hingegen ausgeschlossen werden, da der charakteristische anteriore dorsale Streifen respektive Ring fehlt, welcher in dorsalisierten Embryonen leicht zu erkennen ist (vgl. Abb. 3. 22 c).

snail markiert in allen Embryonen die ventrale Region höchster Dorsal-Aktivität, welche während der Embryogenese, ausgehend von einer Weite von 20% in frühen Stadien auf bis zu 25% des Eiumfangs in späteren Stadien, expandiert und sich nach Erhöhung der Pipe-Dosis aufspaltet. Im WT bleibt die Steigung des Dorsal-Gradienten während der gesamten Entwicklung konstant und wird durch eine ebenfalls konstant weite *sog*- oder *rho*-Domäne reflektiert (Reeves, Trisnadi et al. 2012). Der ausgedehnten *rho*-Expression nach uniformer Überexpression muss demnach ein veränderter, möglicherweise flacherer Dorsal-Gradient zu Grunde liegen.

Die Tatsache, dass trotz uniformer Expression von *pipe* die dorsoventrale Achse eine eindeutige Polarität aufweist und der ventrale Pol wie in WT-Embryonen auch auf der ventralen Seite liegt, deuten darauf hin, dass entweder die *Cy2-Gal4*-Treiberlinie eine leichte, möglicherweise temporale, asymmetrische Expression verursacht oder ein noch unbekannter Faktor an der Initiierung oder Stabilisierung der DV-Achse beteiligt ist. Erst die sehr starke Überexpression von *pipe* bei 29°C mit der *Traffic jam-Gal4*-Treiberlinie (Abbildung 3. 26 und 3. 27) ermöglicht die Überwindung der ventral etablierten Asymmetrie bzw. eines unbekanntes, eine zusätzliche Asymmetrie etablierenden, Faktors. Zwar ist in manchen Fällen noch eine kleine verbleibende *sna*-Expressionsdomäne nachweisbar, die auf eine noch geringe Asymmetrie hindeutet, meistens ist die DV-Polarität aber aufgehoben und nur noch eine radiärsymmetrische Expression von *rho* und *snail* zu beobachten.

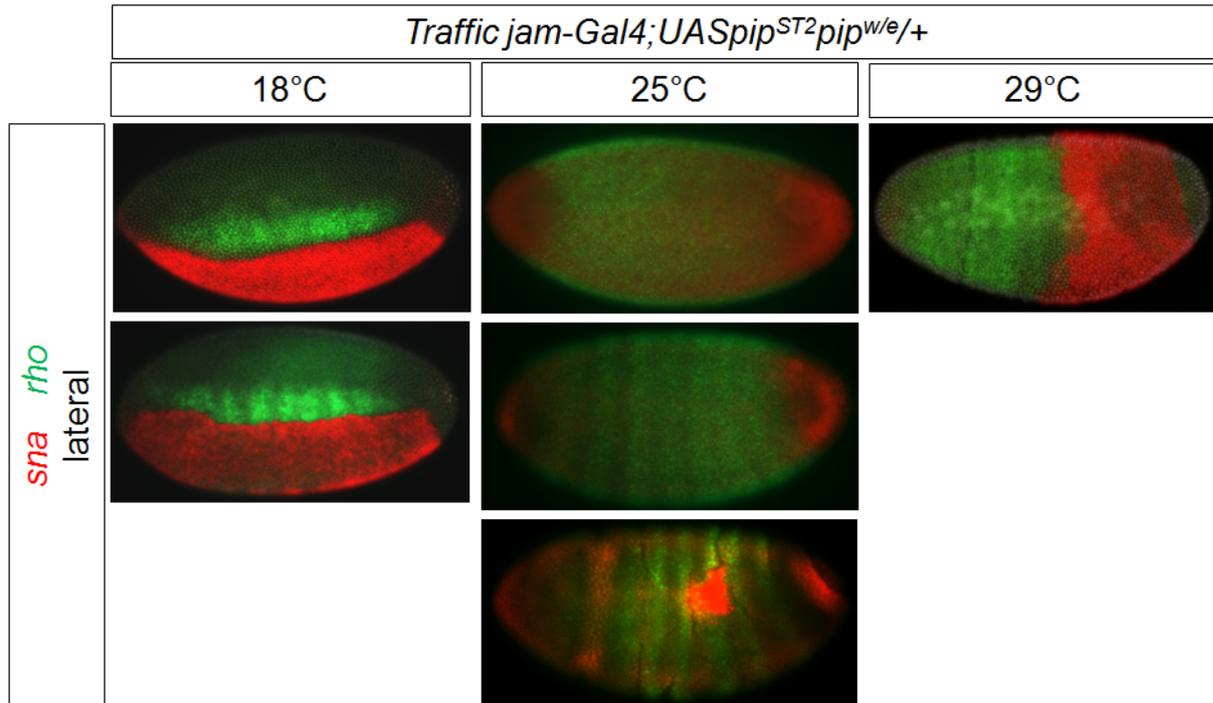


Abbildung 3. 26: Expression der Dorsal-Zielgene *snail* und *rhomboid* in Embryonen nach starker, uniformer Überexpression von *pipe* im Follikelepithel von WT-Weibchen *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der Dorsal-Zielgene in Embryonen von *Traffic jam-Gal4; UASpip^{ST2}pip^{w/e/+}* -Müttern. Bei 18°C wird *snail* ventral und *rho* lateral in einem WT-ähnlichen Muster exprimiert. Bei 25°C ist die bilaterale Symmetrie der *sna*-Expression aufgehoben. Die Expression von *rho* expandiert entlang der gesamten AP-Achse nach dorsal, *snail* wird nur noch an den Termini oder in begrenzten Regionen im posterioren Teil des Embryos exprimiert. Bei 29°C wird *snail* in einer posterioren, *rho* in einer anterioren, ringförmigen Domäne exprimiert.

Überraschenderweise kann durch die Überexpression von *pipe* auch der repressorische Einfluss des Terminalsystems überwunden werden, der normalerweise die Expression der embryonalen, dorsoventralen Gene an den beiden Polen unterdrückt. Die Präsenz von *sna* am anterioren als auch am posterioren Pol deutet auf zwei Maxima des Dorsal-Gradienten an den Termini hin, die durch mittlere intranukleäre Dorsal-Konzentrationen entlang der AP-Achse, die zur Aktivierung der *rho*-Expression führen, getrennt sind. Obwohl die Asymmetrie der DV-Achse aufgehoben ist, wird eine neue Asymmetrie entlang der AP-Achse sichtbar. Auch dieser Phänotyp kann mit der beobachteten Aufspaltung der Achse durch Expansion der *pipe*-Domäne oder durch Erhöhung der Spätzle-Konzentration in Embryonen verglichen werden.

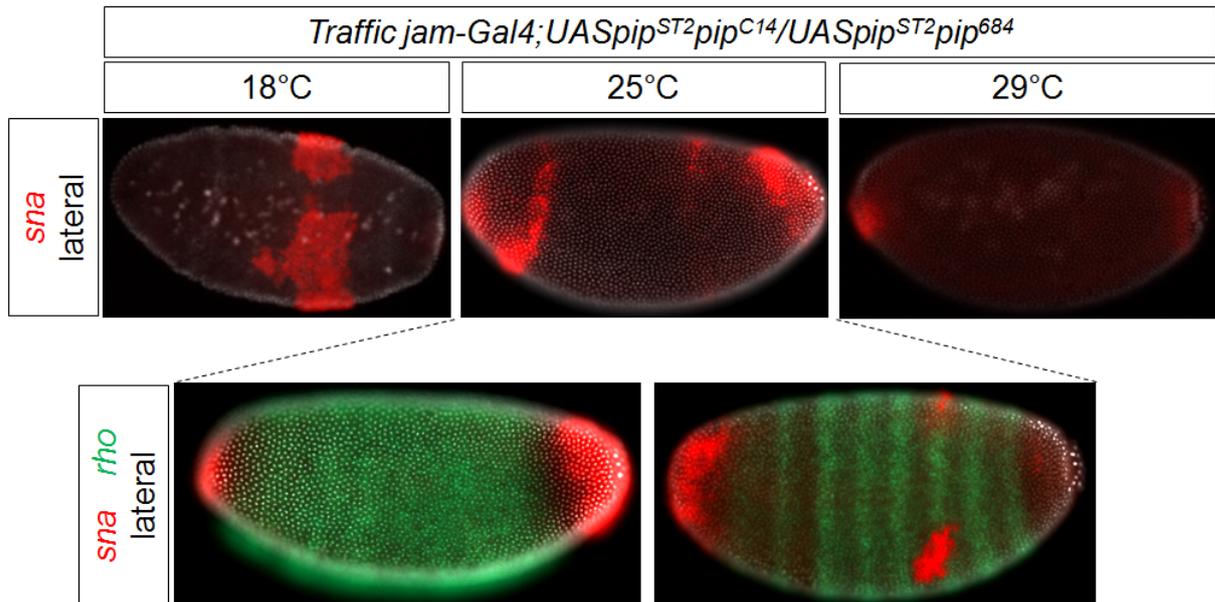


Abbildung 3. 27: Expression der Dorsal-Zielgene *snail* und *rhomboid* in Embryonen nach starker, uniformer Überexpression von *pipe* im Follikel­epithel *In-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der Dorsal-Zielgene in Embryonen von *Traffic jam-Gal4; UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴/UASpip^{ST2}pip^{C14}*-Müttern. Bei 18°C wird *snail* in einem beinahe geschlossenen Ring entlang der DV-Achse im posterioren Drittel des Embryos exprimiert. Bei höheren Temperaturen wird *snail* nur sporadisch im posterioren Drittel des Embryos entlang der DV-Achse exprimiert oder beschränkt sich auf die terminalen Polregionen. *rho* wird bei 25°C in einigen Fällen und bei 29°C meist uniform entlang der gesamten AP- sowie DV-Achse exprimiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass keine oder nur eine sehr geringe Asymmetrie in der uniformen *pipe*-Expression notwendig ist, um eine polarisierte DV-Achse zu initiieren. Unbekannt ist aber, ob eine geringe asymmetrische *pipe*-Expression innerhalb der Eikammer allein schon ausreicht oder ob die *pipe*-Expression einen bestimmten Schwellenwert überschreiten muss, um die Achsenbildung zu initiieren.

3.5.6 Asymmetrische *pipe*-Expression ist nicht ausreichend für die Initiierung der DV-Achsenpolarität

Die endogene ventrale *pipe*-Domäne umfasst etwa 40% des Umfangs einer Eikammer und spezifiziert den ventralen Pol der dorsoventralen Achse. Hierdurch wird eine Asymmetrie in der Eikammer etabliert. Um zu testen ob allein die Etablierung einer Asymmetrie ausreicht, um dorsoventrale Musterbildung auszulösen oder ob noch weitere Faktoren wie eine bestimmte Weite der Expressionsdomäne oder Stärke der *pipe*-Expression oder ein zusätzlicher ventralisierender Einfluss benötigt werden, wurde *pipe* in Ovarien von *UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴/UASpip^{ST2}pip^{C14}*-Fliegen mit dem *55B-Gal4-Treiber* am anterioren oder dem *E4-Gal4-Treiber* am posterioren Pol der Eikammer exprimiert (Abbildung 3. 28).

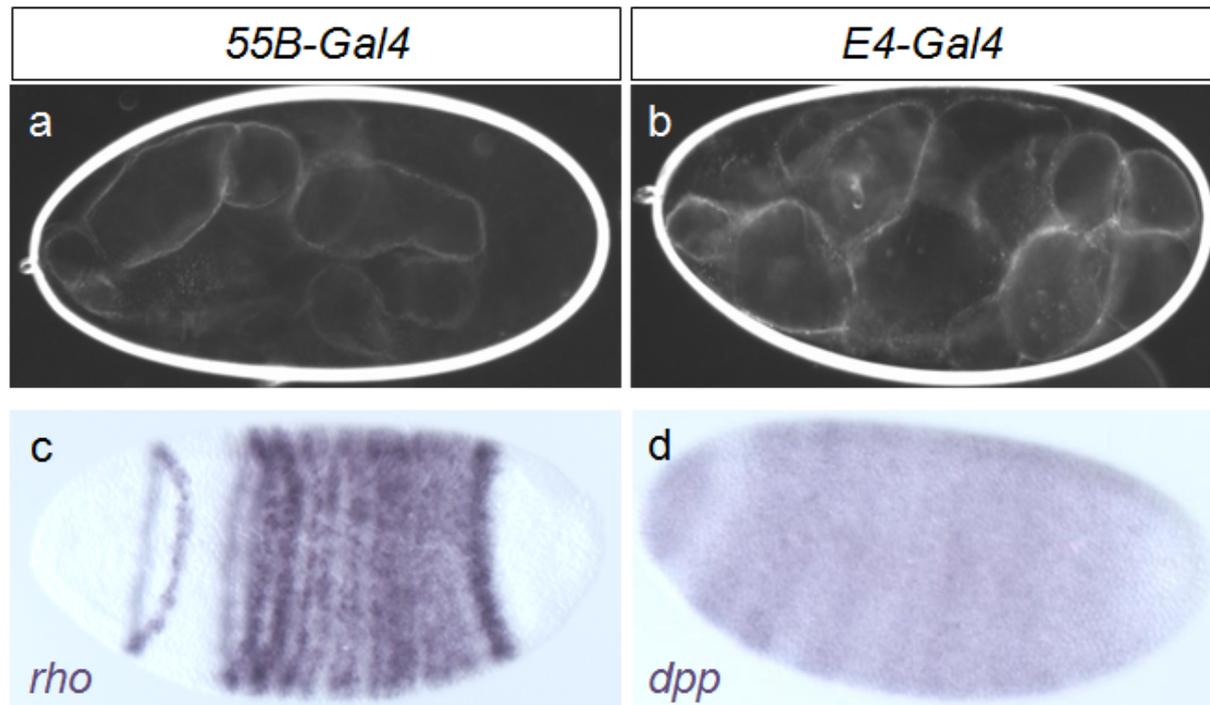


Abbildung 3. 28: Auswirkung anteriorer und posteriorer *pipe*-Expression im *pipe*-negativen Hintergrund auf die embryonale Achsenbildung (a,b) Kutikulapräparate von Embryonen, die mit dem anterioren Pol nach links orientiert sind. In beiden Fällen sind dorsalisierte Kutikulaphänotypen der Nachkommen von *pipe*-negativen Weibchen gezeigt, in denen *pipe* in anterioren Follikelzellen (a) oder posterioren Follikelzellen (b) exprimiert wurde. Die Embryonen bestehen aus einem Schlauch aus dorsalisiertem Gewebe, das durch das Vorhandensein feiner Härchen charakterisiert ist. (c,d) *In-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der dorsoventralen Markergene *rho* (c) und *dpp* (d) in Embryonen von *E4-Gal4/55B-Gal4;UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴/UASpip^{ST2}pip^{C14}*-Müttern. Die lateralen bzw. dorsalen Expressionsdomänen von *rho* sowie *dpp* expandieren symmetrisch um die gesamte embryonale DV-Achse und zeigen eine vollständige Dorsalisierung des Embryos an.

Die Expression von *pipe* in einer begrenzten Population von anterioren oder posterioren Follikelzellen reicht nicht aus, um dorsoventrale Musterbildungsprozesse zu initiieren. In beiden Fällen sind die Nachkommen vollständig dorsalisiert, was am Fehlen ventraler Zähnchenbänder und dem Vorhandensein dorsaler Härchen auf dem gesamten schlauchförmigen Embryo in den Kutikulapräparaten erkennbar ist. Zusätzlich wird diese Dorsalisierung durch die uniforme Expansion der dorsalen *rho*-Expressionsdomäne (vgl. Abb. 3. 28 c) sowie der uniformen Expression von *dpp* (d) entlang der dorsoventralen Achse visualisiert. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *pipe* mittels der Treiberlinien *55B-Gal4* oder *E4-Gal4* zu schwach oder die Expressionsdomäne zu klein ist und Musterbildung erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes initiiert werden kann. Die angenommene minimale Expressionsgröße oder der Schwellenwert werden möglicherweise erst erreicht, wenn *pipe* mit Hilfe der posterior aktiven Treiberlinie *Gal4-DE1* in posterioren Follikelzellen exprimiert wird. In diesem Falle sind am posterioren Pol von Embryonen „ventrale“ Gastrulationsbewegungen zu beobachten (Sen, Goltz et al. 1998).

3.5.7 Etablierung eines Vitellinmembranmarkers zur Detektion von Follikelzellklonen

Die in den voran gegangenen Abschnitten beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass die asymmetrische Expression von *pipe* nicht notwendig ist oder dass ein zusätzlicher Faktor eine ventrale Position der Achsenbildung favorisiert. Möglicherweise wird die Etablierung ventraler Schicksale in der dorsalen Region des Embryos durch diesen Faktor, oder einem, von der endogenen *pipe*-Domäne ausgehenden Inhibitor, unterdrückt oder erschwert.

Zudem kann angenommen werden, dass eine einfache Asymmetrie, die durch eine geringe *pipe*-Expression bedingt wird, nicht ausreicht um embryonale Musterbildungsprozesse im ausreichenden oder korrekten Maße zu initiieren.

Um zu testen, in wie fern Größe und Position der *pipe*-Expressionsdomäne für die Initiierung der embryonalen Musterbildung notwendig sind, wurden ektopische *pipe*-exprimierende Klone im Follikelepithel induziert. Die Korrelation der ektopischen *pipe*-Expression mit den resultierenden embryonalen Mustern erfolgte dann mit Hilfe des RFP-gekoppelten Vitelline membrane like-Protein (VML-RFP) (Zhang, Stevens et al. 2009), welches von Follikelzellen sezerniert und dann in die Vitellinmembran des Embryos eingebaut wird. Wird es nun mittels des UAS/Gal4-Systems mit *pipe* ko-exprimiert, reflektiert VML-RFP die vorangegangene Aktivität respektive Expression von *pipe* im Follikelepithel und die Präsenz enzymatisch modifizierter Vitellinmembrankomponenten, welche die Spaltung von Spätzle im Perivitellinspalt (PVS) durch die proteolytische Kaskade und die Etablierung des Dorsal-Gradienten ermöglichen (Abbildung 3. 29).

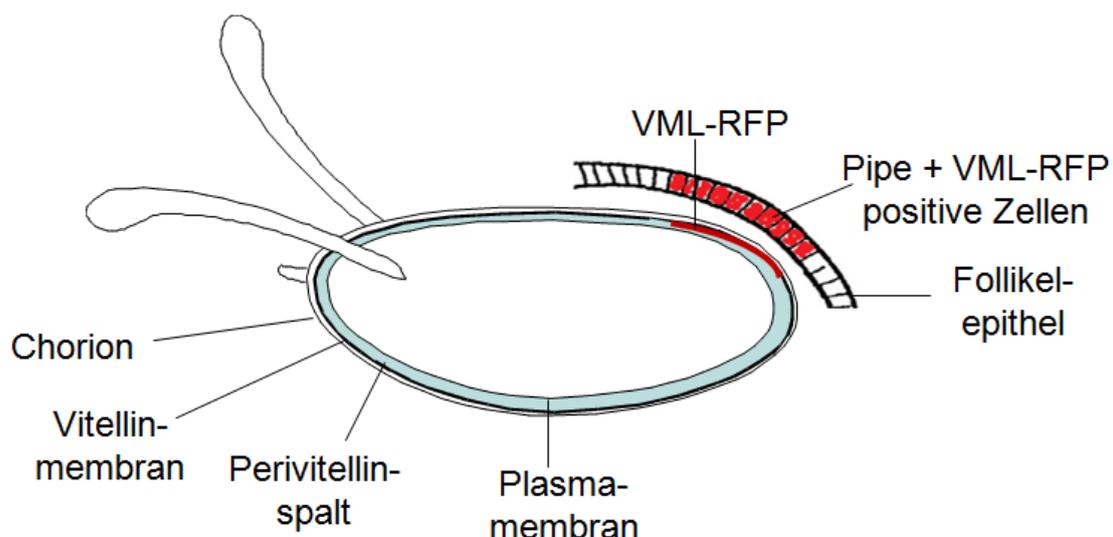


Abbildung 3. 29: Schematische Darstellung der Klonmarkierung durch VML-RFP *pipe*-exprimierende Follikelzellklone exprimieren gleichzeitig VML-RFP, welches in die embryonale Vitellinmembran inkorporiert wird. VML-RFP-markierte Regionen der Vitellinmembran reflektieren Bereiche im Perivitellinspalt des Embryos, die dem Einfluss der von Pipe modifizierten EZM-Umgebung unterliegen und in denen die Initiierung der proteolytischen Kaskade, welche zur Bildung des Toll-Liganden C-Spätzle (C106) führt, ermöglicht wird.

Um zu testen, ob die Inkorporation von VML-RFP in die Vitellinmembran tatsächlich die Position und Größe der induzierten Follikelzell-Klone reflektiert, wurde die Expression von UAS-GFP und UAS-VML-RFP während verschiedener Oogenese-Stadien untersucht (Abbildung 3. 30).

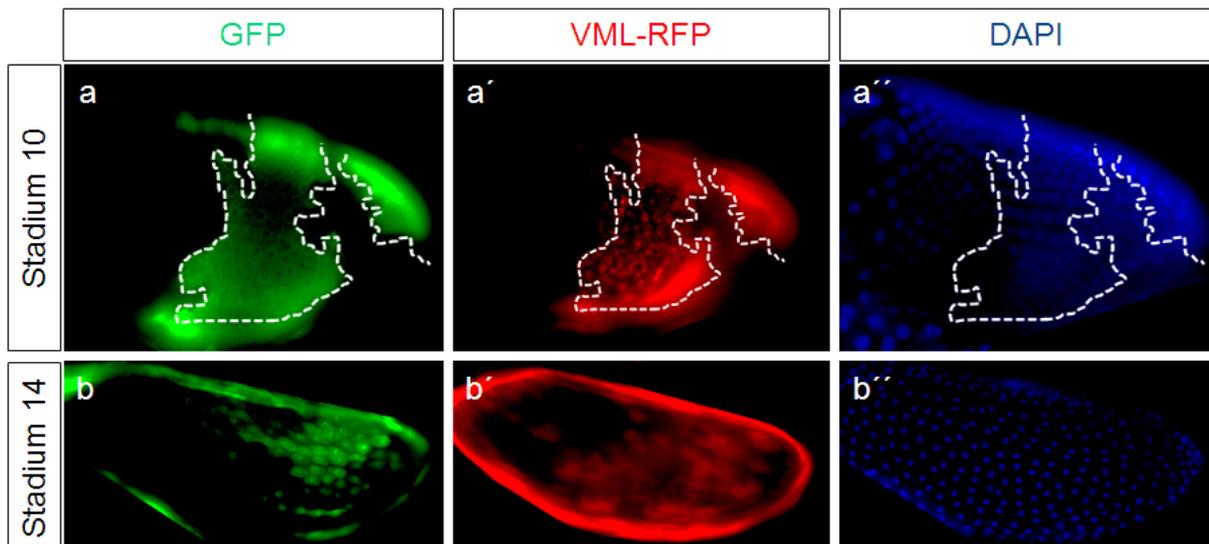


Abbildung 3. 30: Visualisierung von Klonen im Follikelepithel (a-b'') Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10 und Stadium 14 die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. Die Expression des Reportergens *GFP* wurde durch eine anti-GFP-Antikörperfärbung sichtbar gemacht (a, b), während der Einbau von VML-RFP in die EZM im Perivitellinspalt (a') und in die Vitellinmembran (b') direkt visualisiert wurde. Die DAPI-Färbungen zeigen die Unversehrtheit des Follikelepithels (a'',b''). Die gestrichelten Linien markieren den äußeren Rand des induzierten Follikelzellklons, dessen „Abdruck“ sich als VML-RFP in der EZM und in der Vitellinmembran wieder findet.

Im Stadium 10 der Oogenese, in welchem durch die ventrale Expression von *pipe* die dorsoventrale Polarität festgelegt wird, entspricht das Muster des im Perivitellinspalt lokalisierten VML-RFP genau den darüber liegenden GFP-positiven Follikelzellen. In späteren Stadien wird diese Korrelation zwar schwächer, d. h. die Expressionsdomänen beider Proteine sind nicht mehr exakt deckungsgleich wie in Stadium 10, dies kann aber auf morphogenetische Bewegungen der Follikelzellen im Laufe der Oogenese und die unterschiedliche Stabilität beider Genprodukte zurück geführt werden. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass VML-RFP als Marker für die Klon-Lokalisation und Größe herangezogen werden kann.

VML-RFP-markierte Bereiche der Vitellinmembran reflektieren somit den vorangegangenen Einfluss *pipe*-positiver Follikelzellklone und die davon abhängige Modifikation der EZM des Perivitellinspalts.

3.5.8 Kloninduktion

Um zu testen, ob und welchen Effekt die ektopische *pipe*-Expression auf die dorsoventrale Achsenbildung hat, wurden Klone im Follikelepithel induziert. Neben der Kloninduktion im WT-Hintergrund erfolgte die Kloninduktion ebenfalls im Follikelepithel *pipe*-mutanter Weibchen.

Der Nachweis der ektopischen *pipe*-Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung zeigt, dass die Kloninduktion im WT- als auch im mutanten Hintergrund entlang der gesamten anterioposterioren sowie dorsoventralen Achse möglich ist (Abbildung 3. 31).

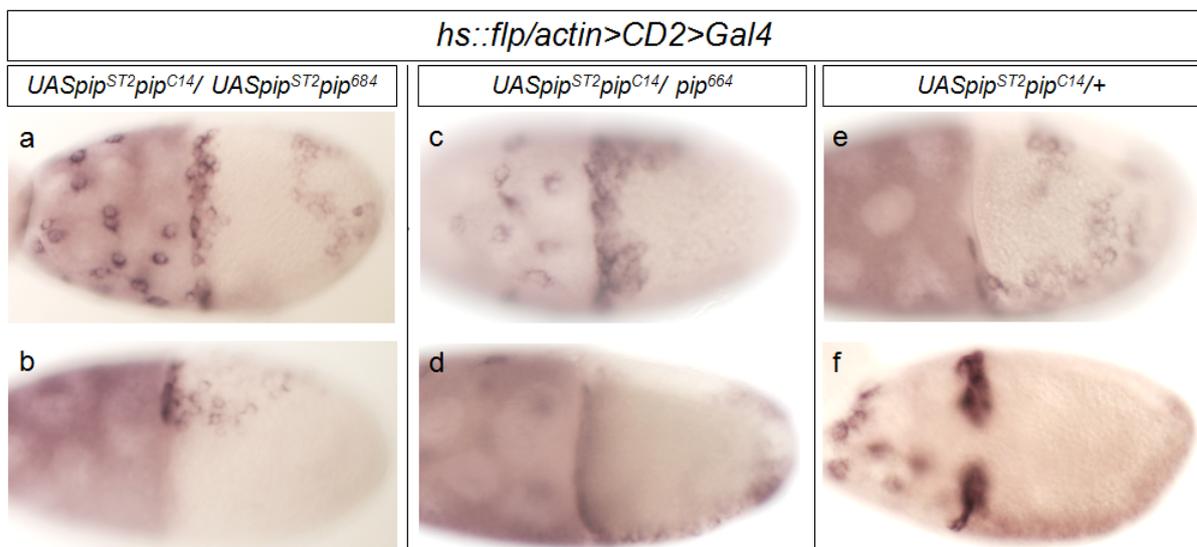


Abbildung 3. 31: *pipe*-Expression nach Klon-Induktion *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *pipe*-Expression nach Kloninduktion im Follikelepithel von Fliegen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen. Alle Eikammern sind mit dem posterioren Ende nach rechts und der dorsalen Seite nach oben orientiert. Die Induktion der *pipe*-positiven Klone kann in *pipe*-negativen- (a-d) als auch in Ovarien mit endogener, wildtypischer *pipe*-Expression (e,f) zufällig entlang der AP- und DV-Achse erfolgen.

3.5.9 Einfluss der Klon-Größe und -Position auf die dorsoventrale Musterbildung im Embryo

Eine einfache Asymmetrie innerhalb der Eikammer, welche beispielsweise durch die auf eine kleine Population anteriorer oder posteriorer Follikelzellen begrenzte Expression von *pipe* etabliert wird, reicht nicht unbedingt aus, um dorsoventrale Musterbildung zu initiieren (vgl. Abschnitt 3.5.6). Die Aktivität von Pipe wird wahrscheinlich in einer ventralen Region, die mindestens 8-12 Follikelzellen weit ist, benötigt. Gefolgert wurde dies aus der Wirkung von *pipe* loss-of-function-Klonen im ventralen Follikelepithel, die erst ab einer bestimmten Größe zum Ausbleiben der *twist*- und der angrenzenden *sog*-Expression führen (Nilson and Schupbach 1998).

Um die Mindestgröße der *pipe*-Domäne, ab der die Expression ventraler und lateraler Musterbildungsgene initiiert wird, direkt zu ermitteln, wurden mittels Hitzeshock *pipe*-exprimierende Follikelzellklone in unterschiedlicher Größe und an zufälligen Positionen im Follikel epithel *pipe*-negativer Fliegen erzeugt (Abbildung 3. 32, 33, 34).

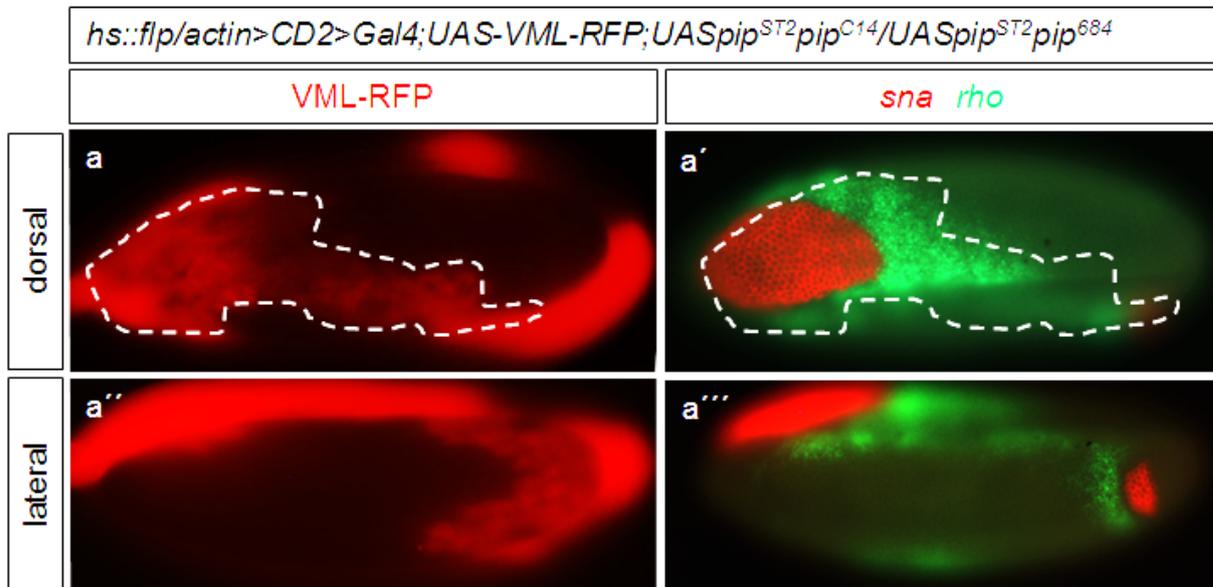


Abbildung 3. 32: Beispiel für den Einfluss eines großflächigen ektopischen *pipe*-Klons im *pipe*⁻Hintergrund auf die embryonale DV-Achse (a,a'') Muster der VML-RFP-Fluoreszenz auf der dorsalen Seite und am lateralen, posterioren Pol in der Vitellinmembran des Embryos. (a',a''') *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *sna*- und *rho*-Expression innerhalb der dorsalen Region und am posterioren Pol. Die gestrichelten Linien markieren den äußeren Rand der VML-RFP-markierten Region der Vitellinmembran und des PVS, der hier enzymatisch veränderte Pipe-Substrate beherbergt. In einer deckungsgleichen Domäne wird der Dorsal-Gradient, reflektiert durch die Expression von *sna* und *rho*, gebildet.

In Embryonen, die der Wirkung großer *pipe*-Klone ausgesetzt waren, bildet sich ein Dorsal-Gradient mit Wildtyp-ähnlichem Charakter, was aus der Expression der Zielgene *snail* und *rhomboïd* geschlossen werden kann. Hierbei zeigt sich, dass die Etablierung des ventralen Pols der DV-Achse sowohl auf der dorsalen wie auch auf der ventrolateralen Seite des Embryos möglich ist (vgl. Abb. 3. 32 a'''). Die Präsenz von *sna* im Zentrum des von VML-RFP markierten Bereichs der Musterbildung und die flankierende *rho*-Expression in einer Weite, die im anterioren und posterioren Teil der AP-Achse überwiegend der Weite der WT-Domäne entspricht, belegt, dass die Eigenschaften des Dorsal-Gradienten denen im WT entsprechen. Im mittleren Teil der AP-Achse ist die Domäne, in welcher Spätzle prozessiert wird wahrscheinlich so schmal, dass der Schwellenwert zur maximalen Aktivierung des Toll-Rezeptors und Etablierung des Dorsal-Maximums nicht erreicht wird. Hier wird nur *rho* exprimiert.

Auch in Embryonen, die dem Einfluss kleiner und mittelgroßer *pipe*-Klone unterliegen, kann ab einer bestimmten Klongröße die Induktion ventraler Zellschicksale festgestellt werden (Abbildung 3. 33).

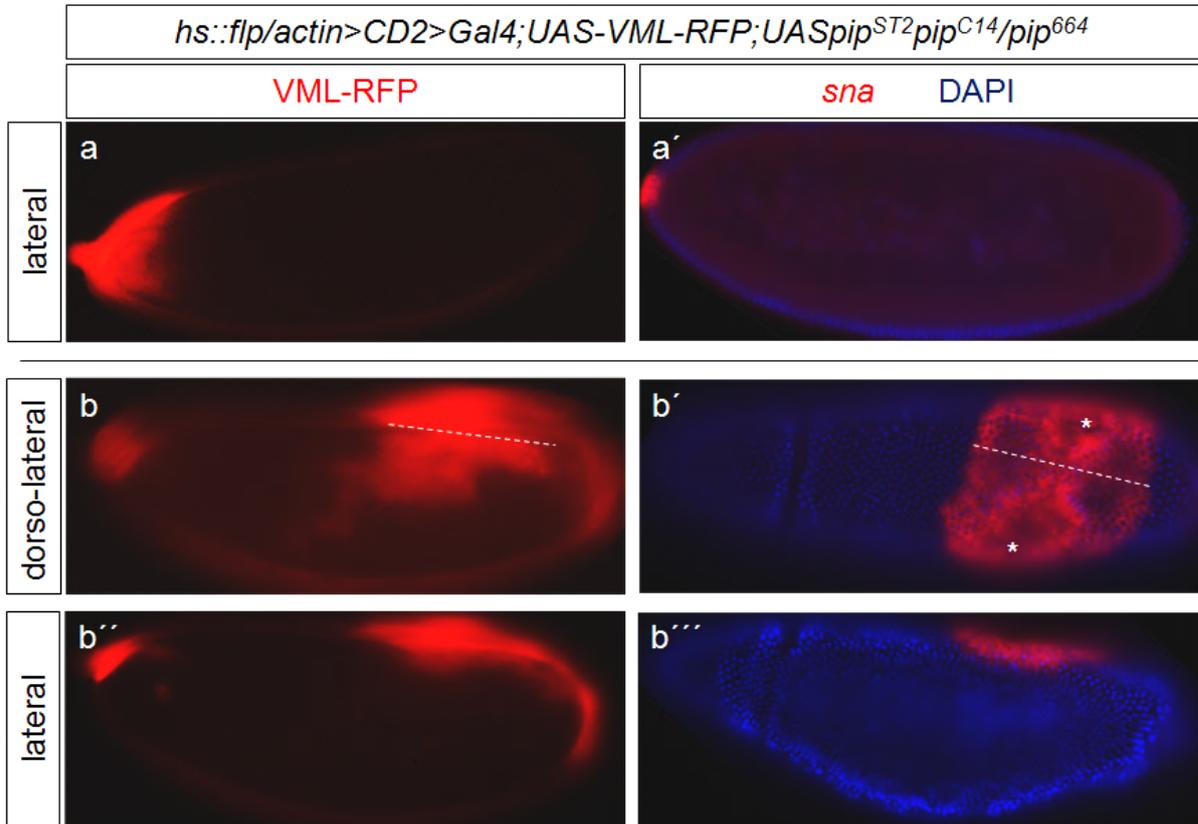


Abbildung 3. 33: Beispiel für den Einfluss einzelner *pipe*-Klone im *pipe*⁻Hintergrund auf die embryonale DV-Achse (a,b,b'') Muster der VML-RFP-Fluoreszenz in der Vitellinmembran zweier verschiedener Embryonen. (a',b',b''') *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *sna*-Expression. (a) VML-RFP markiert eine kleine anteriore Region der Vitellinmembran und des PVS, die enzymatisch von Pipe modifiziert wurde. (a') Im Zentrum dieser Region wird *snail* in einer etwa zehn Zellen umfassenden Domäne exprimiert. (b,b') VML-RFP markiert eine dorsale Domäne, die mehr als 50 Zellen umfasst. (b') *snail* wird in einer weiten Domäne exprimiert, die etwa der Breite der VML-RFP markierten Region entspricht. Zu beiden Seiten der neuen „ventralen“ Mittellinie (gestrichelte Linie) invaginiert das Mesoderm an den mit Sternchen (*) markierten Positionen.

VML-RFP markierte *pipe*-Klone, die weniger als 10 Zellen umfassen, sind nicht in der Lage ventrale oder laterale Zellschicksale zu initiieren. In keinem der betroffenen Embryonen war die Expression der Dorsal-Zielgene *sna* oder *rho* nachweisbar. Ab einer Klongröße von mehr als zehn Follikelzellen ist in den davon beeinflussten Zellen der Embryonen die Expression von *sna* erkennbar. Dabei scheint die Weite der Klone entlang der DV-Achse die Breite des zukünftigen Mesoderms zu bestimmen. Im Gegensatz zu einer kleinen Region, die somit zu einer schmalen Expressionsdomäne wie in Abb. 3. 32 b' oder zum völligen Verschwinden des Dorsal-Maximums führt, bedingt die Expansion von *pipe* über die normale Expressionsgrenzen hinaus die Aufspaltung des Dorsal-Gradienten an der entsprechenden

Position der AP-Achse. Dies wird durch die Bildung zweier Invaginationen neben der „ventralen“ Mittellinie im Embryo in Abbildung 3. 33 (b') visualisiert. Diese Aufspaltung der DV-Achse in zwei Achsenpole ist auch in Nachkommen von *grk*⁻ und *egfr*⁻ Fliegen zu finden (Morisato 2001).

Überraschenderweise wird in Embryonen, die dem Einfluss zweier großer gegenüberliegender Klone unterlagen, nur ein ventraler Pol gebildet (Abbildung 3. 34). In diesem Falle wird der Effekt des dorsalen Klons, die ektopische Aktivierung des Toll-Rezeptors, durch die ventrale Domäne unterdrückt. Möglicherweise wird in dieser Region, die sich an einer ähnlichen Position wie die endogenen *pipe* WT-Domäne befindet, die Bildung des ventralen Pols favorisiert und die Etablierung einer zweiten Achse durch Produktion eines Inhibitors verhindert. Die Annahme eines Prozesses der lateralen Inhibition zur Stabilisierung der DV-Achse wird durch Beobachtungen untermauert, dass selbst sehr große dorsale *Raf*-Klone im Follikel epithel von WT-Müttern nicht in der Lage sind dorsale *twist*-Expression im Embryo zu initiieren (Peri, Technau et al. 2002).

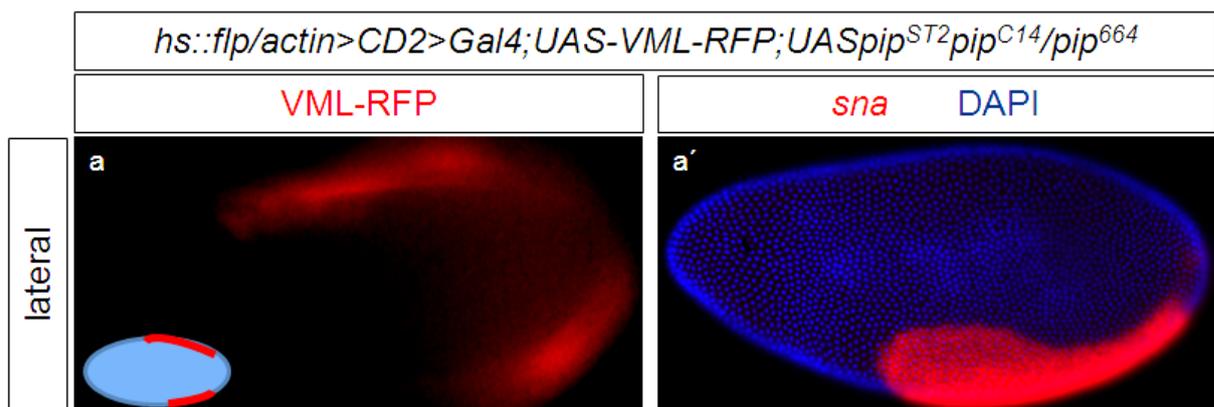


Abbildung 3. 34: Beispiel für den Einfluss zweier gegenüber liegender *pipe*-Klone im *pipe*-Hintergrund auf die embryonale DV-Achse (a) Muster der VML-RFP-Fluoreszenz in der Vitellinmembran eines Embryos samt schematischer Darstellung der Klon-Lokalisation. (a') *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *sna*-Expression. (a) VML-RFP markiert dorsale und eine ventrale Region der Vitellinmembran und des PVS, die enzymatisch von Pipe modifizierten wurden. (a') Die *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung von *sna* zeigt, dass die Etablierung dorsoventraler Musterbildungsprozesse nur auf der ventralen Seite erfolgt. In der dorsalen Region des Embryos wird *sna* nicht exprimiert.

3.5.10 Stabilisierung und Etablierung des ventralen Pols durch laterale Inhibition

Die Beobachtung, dass ektopische *pipe*-Klone auf der dorsalen Hälfte des Embryos bei gleichzeitigem Vorhandensein ausgedehnter ventraler Klone keinen Effekt auf die dorsoventrale Achsenbildung haben, weist darauf hin, dass die Initiierung einer zweiten DV-Achse durch die endogene *pipe*-Domäne verhindert wird. Um diesen inhibitorischen Effekt der ventralen Domäne zu prüfen, wurden *pipe*-exprimierende Follikelzelloklone in WT-

Eikammern erzeugt und deren Effekt auf die Etablierung des Dorsal-Gradienten und die Expression seiner Zielgene untersucht (Abbildung 3. 35).

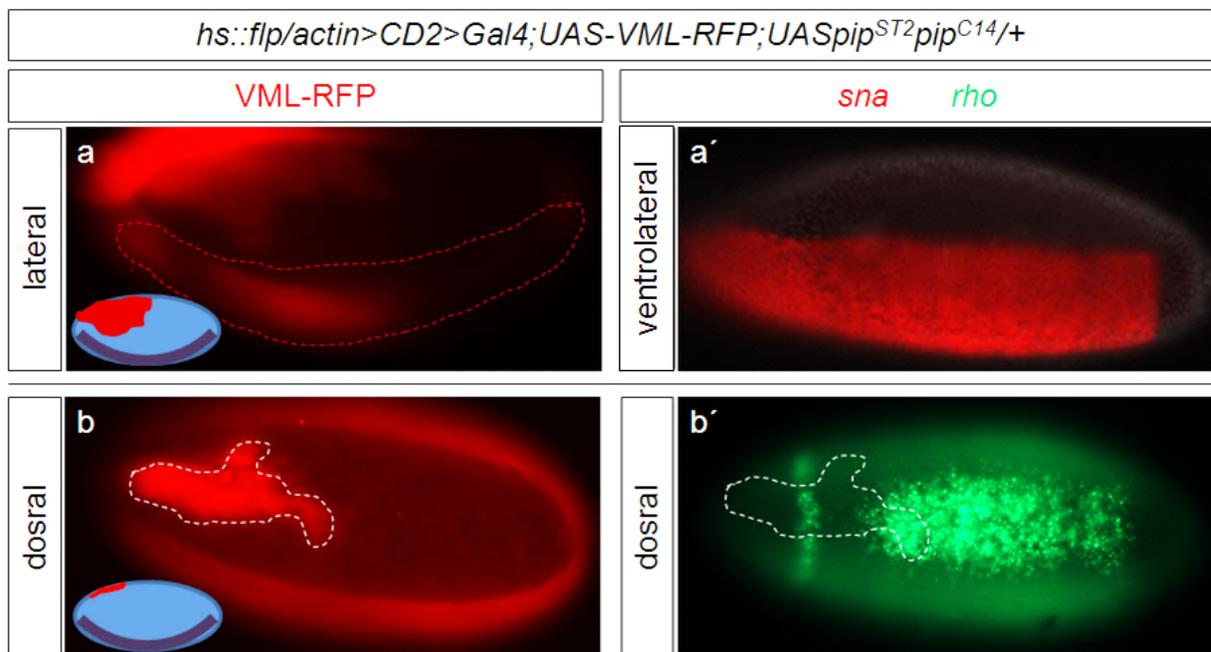


Abbildung 3. 35: Beispiel für den Einfluss dorsaler *pipe*-Klone im WT-Hintergrund auf die embryonale DV-Achse (a,b) Muster der VML-RFP-Fluoreszenz in der Vitellinmembran der Embryonen. In den jeweiligen Schemata ist die Lage des ektopisch induzierten *pipe*-Klons rot, die der endogenen *pipe*-Domäne lila dargestellt. (a',b') *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *sna*-respektive *rho*-Expression. (a) VML-RFP markiert eine dorsale Region der Vitellinmembran und des PVS, die enzymatisch von Pipe modifiziert wurde. Die gestrichelte rote Linie markiert die Region des PVS, die vom endogenen Pipe innerhalb der WT-Domäne modifiziert wurde. (a') Die *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung von *sna* zeigt, dass die Etablierung dorsoventraler Musterbildungsprozesse nur auf der ventralen Seite erfolgt. In der dorsalen Region des Embryos wird *sna* nicht exprimiert. (b) VML-RFP markiert eine kleine dorsale Region der Vitellinmembran und des PVS, die enzymatisch von Pipe modifiziert wurde und sich genau gegenüber der endogenen Domäne befindet. (b') Die *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung von *rho* zeigt, dass die normale, dorsale Expressionsdomäne und die DV-Musterbildung insgesamt durch den ektopischen Klon nicht beeinflusst werden.

Es wurden nur solche Klone in die Analysen mit einbezogen, die mindestens zehn Zellen umfassten und somit in Nachkommen von *pipe*-negativen Fliegen normalerweise in der Lage wären die Expression von *sna* zu initiieren (vgl. Abb. 3. 33). Die Induktion dorsaler Klone in Eikammern mit wildtypischer *pipe*-Expression, hat unabhängig von deren Umfang, keinen sichtbaren Einfluss auf die Bildung der embryonalen dorsoventralen Achse. Sowohl im Falle von Klonen, die nur etwa zehn Zellen weit sind, als auch im Falle großer Klone, die mindestens 50 Follikelzellen umfassen, kann keine ektopische *sna*- oder *rho*-Expression festgestellt werden (vgl. Abb. 3. 35 a',b').

Im Gegensatz zu dorsalen Klonen haben laterale Klone, die an die endogene *pipe*-Domäne angrenzen oder mit dieser überlappen, einen Effekt auf die DV-Achse (Abbildung 3. 36).

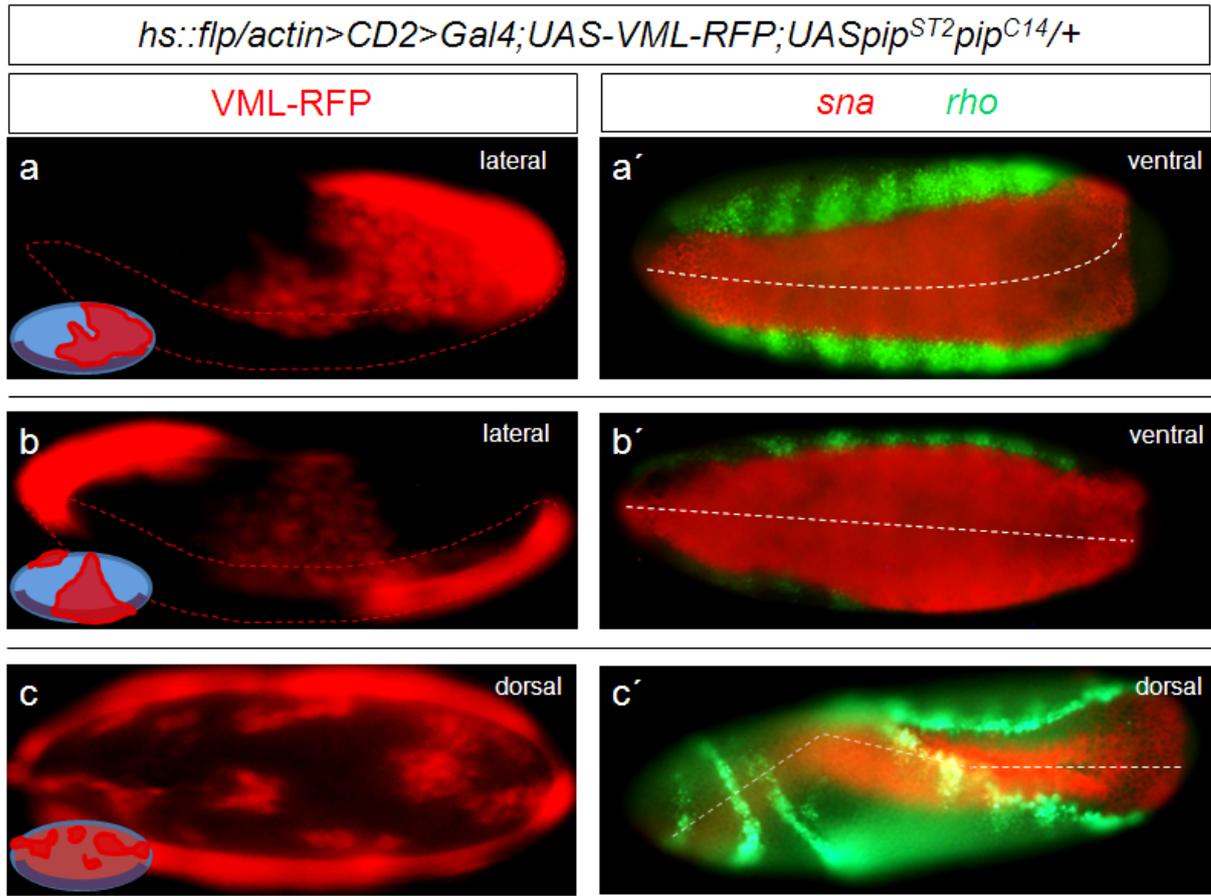


Abbildung 3. 36: Beispiele für den Einfluss lateraler oder dorsolateraler *pipe*-Klone im WT-Hintergrund auf die embryonale DV-Achse (a-c) Muster der VML-RFP-Fluoreszenz in der Vitellinmembran der Embryonen. In den jeweiligen Schemata ist die Lage des ektopisch induzierten *pipe*-Klons rot, die endogene *pipe*-Domäne lila dargestellt. (a'-c') *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *sna*- und *rho*-Expression. (a,b) VML-RFP markiert ausgedehnte dorso-laterale Regionen der Vitellinmembran und des PVS, die enzymatisch von Pipe modifizierten wurden. Die gestrichelte rote Linie markiert die Region des PVS, die vom endogenen Pipe innerhalb der WT-Domäne modifiziert wurde. (a',b') Die *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung von *sna* und *rho* zeigen, dass Klone, welche an die endogene *pipe*-Domäne grenzen, die lokale Expansion der *sna*-Expression bewirken. (a') *sna* expandiert am posterioren Ende oder (b') in der Mitte des Embryos an bestimmten Positionen entlang der AP-Achse (gestrichelte Linie). (c) VML-RFP markiert mehrere kleine dorsale Region im posterioren Teil der Vitellinmembran und des PVS, die besonders stark enzymatisch von Pipe modifizierten wurden und sich gegenüber der endogenen Domäne befinden. (c') Die *in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung von *sna* und *rho* zeigt, dass die Ausdehnung der *pipe*-Domäne zu einer Verdrehung der ventralen Mittellinie führt. In allen drei Embryonen bleibt die Weite der *rho*-Expression hingegen unverändert.

Laterale ektopische *pipe*-Klone vergrößern die endogene *pipe*-Domäne. Dies führt auch in den Nachkommen zu einer Expansion der *sna*-Expression. Da die ventrale Mittellinie normalerweise im Zentrum der *pipe*-Domäne gebildet wird, verlagert sich bei lokaler Expansion der *pipe*-Domäne auch das Zentrum der Aktivierung und dadurch die ventrale Mittellinie in die Mitte der entsprechend verbreiterten *pipe*-Domäne. Während laterale Klone, wie in Abb. 3. 36 a und b gezeigt, nur zu einer leichten Expansion der *sna*-Expression und geringen Störung der Bilateralsymmetrie führen, bedingen Klone, die bis auf die dorsale

Seite reichen eine vollständige Verdrehung des Embryos entlang der AP-Achse. In Abbildung 3. 36 c' ist klar zu sehen, dass der posteriore Teil des Embryos relativ zum anterioren Part um 180°C verdreht ist. Die Invagination des Mesoderms findet hier auf der ventralen sowie auf der dorsalen Seite statt. Die Verlagerung der ventralen Mittellinie geschieht dabei für jeden Abschnitt der AP-Achse unabhängig (Abbildung 3. 36).

Eine Zusammenfassung der Effekte der induzierten *pipe*-Klone findet sich in Tabelle 3. 3.

Tabelle 3. 3: Übersicht über die Effekte der Klonggröße auf die embryonale DV-Achse

maternaler Genotyp	Klonggröße [Zellen] (Position)	Zahl der Embryonen	embryonaler Phänotyp
<i>UASpip^{ST2}pip^{C14}/+</i>	1-10	7	WT
	>10 (dorsal)	20	WT
	>10 (lateral)	5	<i>sna</i> - (Mesoderm-) Expansion
<i>UASpip^{ST2}pip^{C14}/pip⁶⁶⁴</i>	1-10	2	kein <i>sna</i> (Mesoderm)
	>10	8	<i>sna</i> - (Mesoderm-) Induktion
	mehrere >10	3	nur eine <i>sna</i> -Domäne

Wie auch schon in Abbildung 3. 36 gezeigt, sind dorsale, ektopische *pipe*-Klone im WT nicht in der Lage einen neuen ventralen Pol, gekennzeichnet durch ein intranukleäres Dorsal-Maximum oder ektopische *sna*-Expression, zu initiieren (Abbildung 3. 37 a,a',a''). In manchen Fällen ist aber eine Expansion des Dorsal-Maximums zu erkennen (b,b',b''). In keinem Fall findet sich aber ein von der ventralen Domäne isoliertes Maximum von Dorsal-Venus im dorsalen Bereich der Embryonen.

Der fehlende Einfluss dorsaler *pipe*-Klone auf den Dorsal-Gradienten verdeutlicht, dass das postulierte inhibitorische Signal, welches von der ventralen *pipe*-Domäne ausgeht, schon im Perivitellinspalt wirksam sein muss und nicht erst im zellularisierten Embryo selbst.

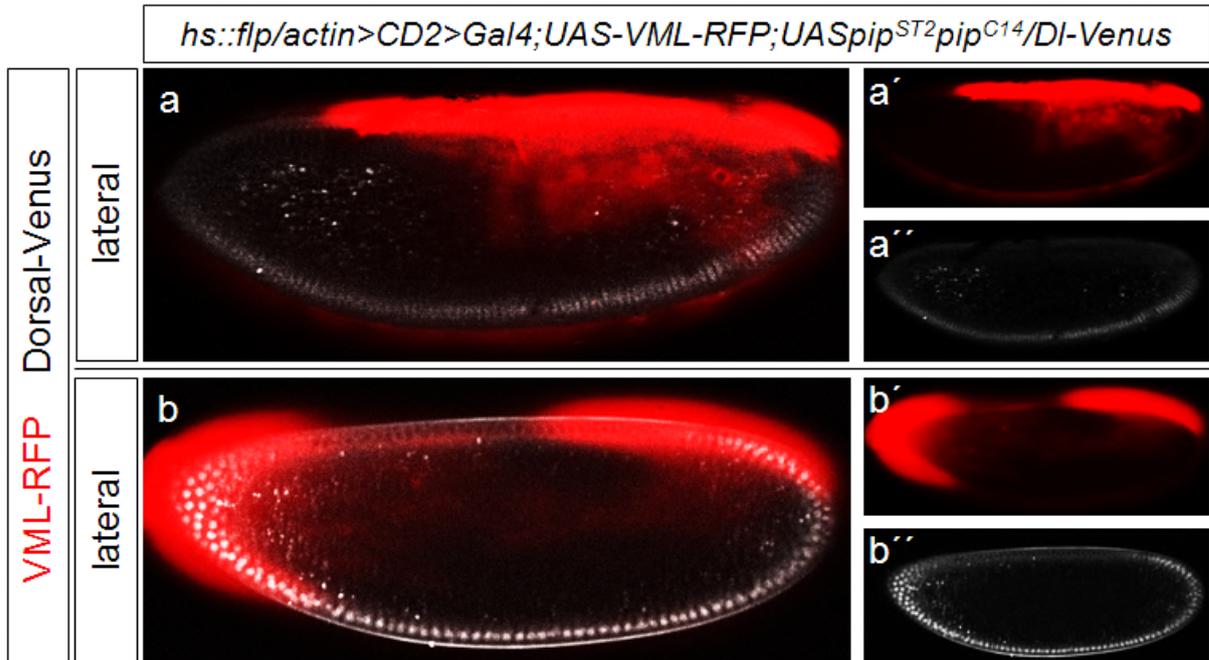


Abbildung 3. 37: Beispiele für den Einfluss dorsolateraler *pipe*-Klone im WT-Hintergrund auf die embryonale DV-Achse (a,b) Muster der VML-RFP-Fluoreszenz in der Vitellinmembran und Verteilung von Dorsal-Venus im Embryo. (a'-b') VML-RFP markiert ausgedehnte dorso-laterale Regionen der Vitellinmembran und des PVS, die enzymatisch von Pipe modifizierten wurden. (a'',b'') Präsenz von Dorsal-Venus entlang der DV-Achse des Embryos. Im ersten Embryo verändert sich der Dorsal-Gradient nicht (a), während im zweiten Embryo an beiden Polen der AP-Achse ein Dorsal-Maximum in dorsalen Kernen auftritt (b).

4 Diskussion

4.1 Reporter-Konstrukte zur Visualisierung der *pipe*-Expression

Die Expression von *pipe* im Follikel epithel von *Drosophila* ist entscheidend an der Etablierung der dorsoventralen Achsenpolarität des Embryos beteiligt (Sen, Goltz et al. 1998; Peri, Technau et al. 2002). Hierfür ist die Beschränkung der Aktivität von *pipe* auf ventrale Follikelzellen essentiell. Dies geschieht durch die EGFR-abhängige Repression der Transkription im dorsalen Teil der Eikammer (Peri, Technau et al. 2002). Für die Untersuchung der transkriptionellen und translationalen Regulation in räumlicher wie auch in zeitlicher Hinsicht ist die Verwendung eines adäquaten Reporters zur Visualisierung des Genprodukts wichtig. Da bis heute kein brauchbarer Antikörper zum Nachweis von Pipe zur Verfügung steht, muss die Visualisierung der Expression mittels transkriptionellen Reporterkonstrukten erfolgen. Mit Hilfe von *pipe-LacZ* konnte die räumliche Verteilung im Verlauf der Oogenese detailliert visualisiert werden (Peri, Technau et al. 2002). Der Nachweis der β -Galactosidase gibt genauen Aufschluss über die Dynamik der vom essentiellen *pipe*-Promotor gesteuerten Expression, die potentielle zeitliche Veränderung der endogenen Proteinverteilung wird durch den Reporter aber nicht reflektiert. Einzig die transkriptionelle Regulation kann von der translationalen Regulation entkoppelt betrachtet werden. Um auch in späteren Oogenesestadien, in welchen sich die mRNA- und Proteinverteilung von *pipe* respektive β Gal nicht mehr decken, die Dynamik des Pipe-Proteins zu beobachten, wurde ein translationaler Reporter eingesetzt. Das im Laufe dieser Arbeit hergestellte Fusionsprotein EGFP-Pipe reflektiert die Verteilung von Pipe in einem höheren Maße, als das Promotor-Fusionskonstrukt *pipe-LacZ* (vgl. Abb. 3.3). Neben der Möglichkeit die Verteilung des Proteins auch in lebendem oder unfixiertem Gewebe zu visualisieren, bieten Fusionsproteine zudem den Vorteil die Auswirkung einer veränderten Expression sofort funktionell zu untersuchen (Chalfie, Tu et al. 1994). Zur Erzeugung des Fusionsproteins wurde der ORF von EGF an den N-terminalen Teil von Pipe fusioniert. Obwohl die 95 Aminosäuren am N-Terminus ein Golgi-Lokalisationssignal darstellen (Sen, Goltz et al. 2000), wird die Lokalisation des Proteins durch die Präsenz von GFP nicht beeinflusst (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). Die katalytische Domäne von Pipe befindet sich am C-terminalen Teil des Proteins (Sen, Goltz et al. 2000). Zwar wird diese nicht direkt durch die Fusion mit GFP beeinflusst, trotzdem ist das Fusionsprotein enzymatisch nicht aktiv. Dies wurde durch Expression des Fusionsproteins in *pipe*⁻ Fliegen untersucht, welche danach immer noch dorsalisierte Nachkommen hervorbrachten. Möglicherweise behindert die GFP-Fusion die korrekte Faltung oder Exposition der katalytischen Domäne (Hebert and Molinari 2007).

Um die räumliche und zeitliche Dynamik von Pipe zu visualisieren und dabei das Problem der sterischen Inhibition zu umgehen, wurde außerdem versucht die Proteine Pipe und GFP durch Herstellung einer bicistronischen mRNA simultan aber als zwei getrennte Proteine zu exprimieren. Hierzu wurde eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*IRES*) verwendet, welche eine spezifische Faltung der mRNA bezeichnet und unabhängig von Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an Ribosomen vermittelt (Jang, Krausslich et al. 1988; Pelletier and Sonenberg 1988). Bei Verwendung des essentiellen *pipe*-Promotors und zwei unabhängigen ORFs, die durch die *IRES* voneinander getrennt sind, werden beide Proteine theoretisch gleichzeitig in ventralen Follikelzellen translatiert. Dabei erfolgt die Synthese des ersten Proteins, hier Pipe, 5'-Cap-abhängig während die Translation von GFP durch die intercistronische Region gesteuert wird. Unglücklicherweise konnte in diesem Fall die Präsenz von GFP in Follikelzellen nicht nachgewiesen werden, sodass auch diese Methode nicht zur Markierung der endogenen Proteinverteilung von Pipe herangezogen werden kann. Die fehlende Funktionalität der *IRES*-Sequenz, welche durch das Ausbleiben der GFP-Expression visualisiert wird, kann neben einer möglichen Instabilität der mRNA auch die fehlende Affinität der Ribosomen zu der verwendeten *IRES* zurück geführt werden. Zudem werden die vor der *IRES* liegenden Elemente in vielen Fällen weitaus starker transkribiert als die *IRES*-kontrollierten Proteine, sodass speziell der Nachweis der Pipe-Translation und -Verteilung sowie allgemein die Beurteilung der quantitativen Expression nicht verlässlich ist (Hennecke, Kwissa et al. 2001). Da für bis zu 115 eukaryotische mRNAs verschiedene *IRES*-Sequenzen beschrieben sind und noch nicht geklärt ist, ob die Aktivität der *IRES* in einer gemeinsamen Sequenz oder einer gemeinsamen sekundären Struktur begründet ist, kann daher auch die Funktionalität im fremden Sequenzkontext nicht beurteilt werden (Mokrejs, Masek et al. 2010).

Eine Alternative zur Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle für die Ko-Expression zweier Proteine stellt die durch das 2A-Peptid hervorgerufene ko-translationale, intraribosomale Proteinseparation dar. Hierbei wird eine etwa 19 Aminosäuren lange Protease-Sequenz zwischen die gewünschten Genprodukte platziert. Während der Translation einer Transkriptionseinheit wird zwischen den letzten zwei Aminosäuren Glycin und Prolin der 2A-Sequenz keine normale Peptidbindung hergestellt, sodass das zwei getrennt Proteine entstehen (Doronina, Wu et al. 2008). Diese 2A-Peptide funktionieren in vielen eukaryotischen Zellen, außerdem wurde gezeigt, dass das 2A-like (auch "CHYSEL") Peptid auch in *Drosophila*-Zellen die multicistronische Expression mehrerer Proteine vermitteln kann (Gonzalez, Martin-Ruiz et al. 2011).

Für die zukünftige Visualisierung und Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung von Pipe und die Auswirkung einer veränderten Verteilung auf die Bildung der embryonalen

Achse wäre dies ein probates Mittel, da die endogene Enzym-Funktion nicht durch das Reporterprotein beeinträchtigt würde. Zudem wäre die quantitative Analyse der Proteinexpression, die beispielsweise durch miRNA-abhängige post-transkriptionelle Regulation beeinflusst wird, möglich.

4.2 Post-transkriptionelle *pipe*-Regulation

Im Rahmen der Analyse des *pipe*-Promotors wurde ein 31 bp langes Repressorelement, als *Motiv B* bezeichnet, identifiziert, welches für die Repression von *pipe* in dorsalen Follikelzellen essentiell ist (Technau, Knispel et al. 2012). Als Reportergen zur Visualisierung der Promotorfunktion wurde *LacZ* verwendet, welches unter Kontrolle des essentiellen 1,5 kb langen Promotors die Expression und Verteilung von endogenem Pipe reflektiert. Die Deletion des Repressorelements aus dem *pipe*-Promotor führte zu einer uniformen Expression des Reportergens im gesamten Follikelepithel. Wird hingegen das endogene Genprodukt *pipe* unter Kontrolle dieses modifizierten Promotors exprimiert, ergibt sich überraschenderweise ein völlig anderes Bild. Die *pipe*-mRNA ist im Gegensatz zur β -Galactosidase nur im ventralen Teil der Eikammer nachweisbar. Daher wurde angenommen, dass die dorsale Repression von *pipe* nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch auf post-transkriptioneller Ebene erfolgt. Da die *LacZ*-mRNA sich in bestimmten Sequenzeigenschaften von der *pipe*-mRNA unterscheidet, würde ein möglicher post-transkriptioneller Einfluss durch dessen Expression nicht reflektiert.

Die Oogenese in *Drosophila* ist ein Entwicklungsprozess, in dem die Kontrolle der Genexpression in einem besonders starken Maße von der post-transkriptionellen Regulation abhängt (Lipshitz and Smibert 2000). Diese post-transkriptionelle Genregulation gründet auf spezifischen RNA-RNA- oder RNA-Protein-Wechselwirkungen, die entweder in der Degradation der Ziel-RNA münden - beispielsweise durch Poly(A)-Verkürzung (Meijer, Bushell et al. 2007) oder die Aktivität von miRNAs (Bartel 2009) - oder aber den Zugang der Ribosomen zum Start-Codon und somit die Translation verhindern. Da durch eine eindeutig ventrale und keinesfalls uniforme Präsenz der *pipe*-mRNA Letzteres ausgeschlossen werden konnte, wurde speziell die Beteiligung von microRNAs an der Regulation der räumlichen Verteilung der *pipe*-mRNA untersucht.

In *Drosophila* sind bis heute mindestens 150 microRNA kodierende Gene identifiziert und noch weit aus mehr vorhergesagt worden. Die Annahme, dass eine miRNA bis zu 100 Zielgene regulieren kann, lässt darauf schließen, dass sich die Zahl der miRNA-regulierten Gene ungefähr mit der Zahl Protein-kodierender Gene deckt (Brennecke, Stark et al. 2005). Einigen microRNAs wurde bereits eine funktionelle Relevanz für verschieden

Entwicklungsprozesse nachgewiesen. Beispielsweise ist *mir-14* zusammen mit *mir-6* und *mir-11* an der Regulation des Reaper-abhängigen Zelltods im Embryo (Ge, Chen et al. 2012) und des Fettmetabolismus beteiligt (Xu, Vernooy et al. 2003). Im Falle der *bantam*-miRNA konnte sogar dessen Interaktion mit *dFmr1* und die Beteiligung an der Regulation des Schicksals der Keimbahn-Stammzellen in Ovarien nachgewiesen werden (Yang, Xu et al. 2009).

Obwohl die Deletion der vorhergesagten miRNA-Bindestellen aus der 3'-UTR der *egfp-pipe*-mRNA nicht zu einer Änderung der räumlichen Verteilung respektive uniformen Präsenz führte, konnte zumindest innerhalb der endogenen Expressionsdomäne eine erhöhte GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, welche möglicherweise auf die Stabilisierung der mRNA oder die ausbleibende Hemmung der Translation zurück zu führen ist. Als Kandidaten für eine Interaktion mit der *pipe*-mRNA kämen die im gesamten Follikel epithel uniform exprimierte miRNAs *mir-11* und *mir-283* in Frage. Die Beteiligung weiterer miRNAs kann auf Grund möglicherweise fehlender Annotationen oder Vorhersagen aber nicht ausgeschlossen werden. Da bisher für keinen miRNA-Kandidaten oder eine andere bekannte miRNA eine asymmetrische Expression im dorsalen Teil der Eikammern gezeigt werden konnte, ist die Repression von *pipe* in dorsalen Follikelzellen durch einen microRNA-abhängigen Mechanismus jedoch recht unwahrscheinlich.

Auch die biologische Relevanz der miRNA-Regulation von *pipe* während der Oogenese bezüglich der Protein-Konzentration ist wahrscheinlich nicht sehr groß. Zumindest hat die Abnahme der *pipe*-Menge um 50% (beispielsweise in heterozygoten Fliegen, vgl. Abb. 3. 35) keinen sichtbaren Einfluss auf die dorsoventrale Achsenbildung im Embryo.

Im Laufe der Analysen der Reportergene in den transgenen Fliegen wurde zudem klar, dass die Unterschiede zwischen der Verteilung der *pipe*-mRNA, des EGFP-Pipe-Fusionsproteins und der β -Galactosidase besonders unter Kontrolle des *1,6kb- ΔB* -Promotors nicht so drastisch sind wie zuerst angenommen und eher in Mängel der jeweilig gewählten Nachweismethode begründet liegen. Während der Nachweis der mRNA durch in situ-Hybridisierung eventuell nicht sensitiv genug ist, um auch sehr geringe *egfp-pipe*-Mengen, die zur dorsalen Proteinexpression von EGFP-Pipe reichen, zu visualisieren, vermittelt der Nachweis des *LacZ*-Reporters durch die Antikörperfärbung ein verfälschtes Bild bezüglich der relativen Proteinmengen in ventralen und dorsalen Follikelzellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die EGFP-Pipe-Expression die Promotoraktivität am realistischsten reflektiert. Die aber weiterhin zu beobachtende deutliche dorsale Repression von *pipe* unter Kontrolle des Promotors, aus dem das Repressorelement *Motiv B* deletiert wurde, bestätigt, dass dieses Element für die transkriptionelle Regulation in dorsalen Follikelzellen allein nicht ausreichend ist. Da die bisherigen Ergebnisse gegen einen post-

transkriptioneller Mechanismus sprechen, muss die Beteiligung weiterer *cis*-regulatorischer Elemente innerhalb des *pipe*-Promotors an der dorsalen Transkriptionsrepression in Betracht gezogen werden.

4.3 Motiv B respektive die IBS ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Vermittlung der dorsalen *pipe*-Repression

Da das *Motiv B* der einzige Kandidat für eine mögliche Bindesequenz eines transkriptionellen Repressors und zudem für die dorsale Repression eindeutig notwendig war, wurde geprüft, ob diese *cis*-regulatorische Sequenz allein auch ausreichend ist, die dorsale Repression zu vermitteln. Hierzu wurde ein Reporterassay in Schneider 2-Zellkultur durchgeführt. Die Integration des Repressorelements in den konstitutiv aktiven *Actin5C*-Promotor sollte die Expression des GFP-Reporters unterdrücken, wenn die verwendete Sequenz alleine ausreicht, die für die Repression notwendigen Transkriptionsfaktoren zu binden. Eine Abnahme der GFP-Fluoreszenz war aber weder im Falle von *Motiv B* noch im Falle des zusätzlich getesteten Repressorelements *Motiv 2* zu beobachten.

Die unveränderte Reporterexpression kann auf verschiedenen Ursachen beruhen. Neben der Möglichkeit, dass die Repressorelemente selbst nicht funktional sind, könnte auch die fehlende Expression des zuständigen Transkriptionsfaktors in den verwendeten S2-Zellen verantwortlich sein. S2-Zellen sind aneuploid für etwa 43 Mb des gesamten Genoms und weisen zudem einen männlichen Genotyp auf (Zhang, Malone et al. 2010). In RNA-Seq-Experimenten konnte für verschiedene Zelllinien das Ausbleiben der Expression von Genen, die für bestimmte Entwicklungsprozesse oder Strukturen verantwortlich sind, ermittelt werden. So werden beispielsweise viele Ovarien-spezifische Chorion-Proteine in Zellkultur nicht exprimiert, während im Gegenzug einige Gene, wie etwa *kekkon* oder *pnt* in Zellkulturen in einer höheren Transkriptanzahl vorhanden sind als im normalen Gewebe oder in einzelnen Individuen. Auch der in die transkriptionelle Regulation von *pipe* involvierte EGFR-Signalweg ist in den meisten Zelllinien und wohl auch in S2-DRSC-Zellen nicht aktiv. Zusätzlich wird von den 711 untersuchten Transkriptionsfaktoren ein Drittel nicht in den S2-Zellen exprimiert (Cherbas, Willingham et al. 2011).

Um zu ermitteln, ob die ausbleibende Repression des Reportergens in Zellkultur unter Kontrolle des *Actin5C*-Promotors mit der integrierten *cis*-regulatorischen Sequenz *Motiv B* auf dem Fehlen des notwendigen Repressorproteins oder eines benötigten Ko-Faktors beruht, müsste die Funktion des Promotor-Konstrukts zusätzlich *in vivo* untersucht werden. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Länge des gewählten *Motiv B* als auch des *Motiv 2* nicht ausreicht und auch die Sequenzumgebung nicht adäquat ist, um eine Bindung des

Transkriptionsfaktors sowie potentieller Ko-Faktoren zu erreichen. Außerdem könnte die Entfernung und die Orientierung der Repressorsequenz in Relation zum basalen Promotor die Effektivität der Repression beeinflussen.

Hinweise, dass die Länge, Position und Orientierung des *Motiv B* innerhalb des endogenen Promotors für dessen Wirkung essentiell sind, geben die Promotor-Shift-Experimente. Das *Motiv B* wurde aus seiner ursprünglichen Promotorumgebung deletiert und an anderer Position wieder integriert. Sowohl in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstart als auch distal 1,5 kb davon entfernt liegend ist das Repressorelement nicht mehr in der Lage die Expression des β -Galactosidase-Reporters in dorsalen Follikelzellen zu unterdrücken (vgl. Anhang Abbildung A 6). Eine Erklärung dafür wäre, dass die Sequenzumgebung, d. h. das Arrangement zusätzlicher benötigter Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS), oder auch die Länge des Motivs selbst nicht mehr für die Bindung eines oder mehrerer Repressorproteine ausreichen. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Repositionierung der TFBS in eine Sequenzumgebung mit fehlender DNA-„Biegsamkeit“ (Saiz and Vilar 2008) die DNA-Bindung des Repressorproteins oder die Kooperation dieses Repressors mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verhindert (Gaston and Jayaraman 2003).

Der Einfluss der beiden Faktoren - Sequenzlänge der TFBS sowie deren Position im Promotor - ließe sich ebenfalls durch *in vivo*-Untersuchungen mit den oben beschriebenen *Actin5C*-Promotor-Konstrukten klären.

Bereits untersucht wurde der Effekt eines erweiterten *Motiv B*, hier *Motiv 69*, das dem *Motiv r1* (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012) und *pipMRE* (Fuchs, Cheung et al. 2012) entspricht. Innerhalb dieser Sequenz wurde kürzlich die Präsenz mehrerer Iroquois-Bindestellen (*IBS*) festgestellt. Trotz Deletion dieser erweiterten Repressorsequenz aus dem endogenen *pipe*-Promotor ist die Expression der Reporter EGFP-Pipe (vgl. Abb. 3. 18) oder β -Galactosidase (vgl. Abb. 1. 4) in dorsalen Follikelzellen immer noch leicht reprimiert. Dies bedeutet, dass neben diesen *IBS*, welche vom Transkriptionsfaktor Mirror gebunden werden können, zusätzliche Sequenzelemente für die Repression von *pipe* verantwortlich sein müssen.

4.4 Mirror als EGF-regulierter transkriptioneller Repressor von *pipe*

Zur Identifizierung des EGFR-regulierten Repressors wurde die Aktivität zahlreicher Transkriptionsfaktoren im Follikelepithel von *Drosophila* ausgeschaltet und die Auswirkung auf die Expression von *pipe* mit Hilfe der *pipe-LacZ*-Reporterlinie visualisiert. Von den bekanntermaßen EGFR-abhängigen Transkriptionsfaktoren (TF) war keiner an der dorsalen Repression beteiligt (Technau, Knispel et al. 2012). Zwar war angenommen, dass die EGF-induzierte *mirror*-Expression zur Etablierung einer Notch-Fringe-Grenze in der lateralen

Region des Follikel epithels beiträgt, von wo aus dann bestimmte Moleküle sezerniert werden, die *pipe* reprimieren. Durch klonale Analysen wurde aber die Beteiligung des Homeobox-Transkriptionsfaktors Mirror an der Regulation der *pipe*-Expression ausgeschlossen (Peri, Technau et al. 2002). Einzig dem TF Capicua war eine zellautonome, aktivierende Funktion zugeordnet worden (Technau, Knispel et al. 2012).

Umso überraschender ist, dass kürzlich die Präsenz von *cis*-regulatorischen Sequenzelementen im *pipe*-Promotor nachgewiesen wurde, die von Mirror gebunden werden können (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012) und dass *mirror loss-of-function* Klone zur Derepression von *pipe* führen.

Diese Erkenntnis, die im Kontrast zu den vorherigen negativen Resultaten steht, lässt sich möglicherweise durch die Verwendung eines *mirror*-Allels erklären, welches anders als *mirr^{e48}* keine Restaktivität mehr besitzt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass *pipe* sehr empfindlich auf schon geringe Mirror-Level reagiert und die *pipe*-Expression selbst in solchen Follikelzellen reprimiert wird, in welchen Mirror kaum mehr nachweisbar ist (Jordan, Clegg et al. 2000; Zhao, Woolner et al. 2000).

Dass die Bindung von Mirror an die *IBS* wahrscheinlich mit sehr hoher Affinität erfolgt und somit nur geringe Protein-Levels zur Repression von *pipe* benötigt werden, könnte erklären, weshalb im Western Blot nach DNA-Affinitätschromatographie keine spezifische Proteinbande erkennbar war. Der Nachweis einer DNA-Bindung konnte deshalb möglicherweise nur durch die sehr viel sensitivere Methode des *Elektrophoretic Mobility Shift Assay* bei Verwendung radioaktiv markierter „capture“-DNA erfolgen. Hiermit wurde bestätigt, dass Mirror an die Sequenz ACACGA bindet (Andreu, Gonzalez-Perez et al. 2012; Fuchs, Cheung et al. 2012), die der *Iroquois Binding Site (IBS)* mit dem ACAnnTGT-Motiv ähnelt, welche *in vitro* als minimale Mirror-Bindestelle dient (Bilioni, Craig et al. 2005). Die palindromische *IBS* findet sich vier Mal in der etwa 50 bp langen *cis*-regulatorischen Sequenz im Promotor von *pipe* etwa 1 kb vor dem Transkriptionsstart. Besonders essentiell für die Mirror-Bindung ist die von links aus gesehen zweite palindromische Bindestelle (vgl. Abb. 1. 4). Deren Mutation verhindert die Bindung von Mirror an die gesamte Sequenz und wäre eine weitere Erklärung, warum mit der verwendeten Sequenz *Motiv B*, in welcher ein Teil der zweiten *IBS* fehlt, durch die DNA-Affinitätschromatographie keine Aufreinigung des TF möglich war.

Der bereits erwähnte aktivierende Einfluss von Capicua (Cic) auf die Expression von *pipe* (Technau, Knispel et al. 2012) wird indirekt ausgeübt und zwar indem Mirror in ventralen Follikelzellen durch Cic herunter reguliert wird.

4.5 Identifizierung weiterer potentieller *cis*-regulatorischer Elemente auf Grundlage der Sequenzkonservierung

Durch die Analyse zahlreicher *LacZ*-Reporterkonstrukte konnte die minimale *cis*-regulatorische Region von *pipe* auf eine etwa 1 kb distal des Transkriptionsstarts liegende Sequenz, bestehend aus etwa 150 bp, eingegrenzt werden (Technau, Knispel et al. 2012). Diese Region birgt mehrere Sequenzabschnitte, welche bis hin zu *Drosophila grimshawi* stark konserviert sind. Innerhalb dieser essentiellen Promotorregion liegt das *Motiv B*, welches notwendig, aber nicht ausreichend für die dorsale Repression von *pipe* ist. Auf Grund der starken Konservierung der umliegenden Sequenz wurde dieses Motiv erweitert und dieser längere Sequenzabschnitt, *Motiv 69*, ebenfalls auf seine repressorischen Eigenschaften untersucht. Die Deletion dieses erweiterten Sequenzabschnitts führte leider nicht zu einer Verstärkung des Phänotyps, d. h. zur vollständig uniformen Expression von *pipe* sondern war vergleichbar mit der durch die Deletion von *Motiv B* erreichten Derepression von EGFP-Pipe (vgl. Abb. 3. 4 und 3. 18).

Das Alignment der *pipe*-Promotorsequenzen der zwölf sequenzierten *Drosophiliden* führte zudem zur Identifizierung von zwei weiteren konservierten Abschnitten. Die in Abb. 3. 11 mit einem blauen Balken unterlegte Sequenz entspricht dem bereits getesteten und funktionslosen *Motiv A* (Technau, Knispel et al. 2012). Zusätzlich findet sich zwischen den getesteten Motiven *Motiv A* und B/69 noch das mit einem orangen Balken unterlegte *Motiv 1*. Da dieses erst kürzlich identifiziert wurde und zudem einen hohen A/T-Gehalt aufweist, ist es noch nicht auf seine Funktion untersucht worden. Wird nun die Tatsache berücksichtigt, dass zusätzlich zu den innerhalb des *Motiv 69* lokalisierten *IBS* Bindestellen noch weitere TFBS im *pipe*-Promotor benötigt werden, wäre es möglich, dass diese im Bereich um *Motiv 1* liegen.

Die Konservierung der Promotor-Sequenz, welche in diesem Fall als Kriterium zur Identifizierung möglicher Motive herangezogen wurde, muss aber nicht unbedingt ein verlässlicher Indikator für die Präsenz eines *cis*-regulatorischen Elements sein. Obwohl im *pipe*-Promotor die Mirror-Bindestellen durch eine starke Konservierung ausgezeichnet sind, konnte beispielsweise der Sequenz von *Motiv A* keine funktionale Relevanz zugeschrieben werden. Zwar wurde gezeigt, dass beispielsweise 74% der in *D. mel* identifizierten regulatorischen Elemente des *Enhancer of Split gene complex* auch in *D. pseudoobscura* stark konserviert sind (Macdonald and Long 2005); oftmals sind aber *cis*-regulatorische Sequenzen nicht stärker konserviert als benachbarte Abschnitte (Emberly, Rajewsky et al. 2003; Berman, Pfeiffer et al. 2004; Moses, Pollard et al. 2006; Wittkopp 2006). Trotz allem sollte die Funktion von *Motiv 1* durch Deletion aus dem *pipe*-Promotor eventuell auch in

Kombination mit weiteren bekannten oder potentiellen *cis*-regulatorischen Sequenzabschnitten (z. B. *Motiv 69*, *Motiv A*) getestet werden.

4.6 Identifizierung von TFBS mittels verschiedener Vorhersage-Programme

Mittels verschiedener TFBS-Vorhersage-Programme wurde die essentielle Promotorregion von *pipe* auf die Präsenz bekannter TFBS untersucht, da für die bereits getesteten EGFR-regulierten Transkriptionsfaktoren kein repressorischer Effekt auf die Expression von *pipe* gezeigt werden konnte. Da die Detektionsrate eines Programms allein meist schlecht ist, wurden drei verschiedene TFBS-Vorhersage-Programme parallel verwendet, um die Ergebnisse zu verbessern. Es wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer biologisch relevanten TFBS im *pipe*-Promotor hoch ist, wenn diese von mehreren Programmen vorhergesagt wird. Angesichts der Verwendung dreier Programme war zwar die große Zahl an Kandidaten, welche von nur einem oder zwei Programmen vorhergesagt wurden, nicht überraschend. Allerdings wurde nur die Bindestellen für Dorsal und Hunchback von allen drei Vorhersage-Programmen identifiziert. Auf Grund ihrer auf die Nährzellen beschränkte Expression während der Oogenese (Steward, McNally et al. 1984; Rushlow, Han et al. 1989; Margolis, Borowsky et al. 1994) kann eine Beteiligung an der Regulation von *pipe* mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Für alle 38 weiteren Kandidaten, die von nur einem oder zwei Programmen identifiziert wurden, sind die Expressionsdaten gesichtet worden, um mögliche Kandidaten zu identifizieren, die in Eikammern exprimiert sind. Dabei fiel auf, dass beispielsweise Gene des *BR-C* oder *slbo*, die zwar nachweislich im Verlaufe der Entwicklung in Ovarien benötigt werden, laut modENCODE aber nur geringe Expressionslevel in Ovarien erreichen. Daher konnte die ausgewiesene Expressionsstärke, sofern die Expressionsmuster im Follikelepithel unbekannt sind, nicht als Kriterium zur Eingrenzung der Kandidaten herangezogen werden.

Unter den vorhergesagten TFBS fanden sich auch die für *CF2* und *tramtrack*, zwei vom EGF-Signalweg regulierte Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Hinweise, dass zumindest *CF2* eine Rolle bezüglich der dorsoventralen Musterbildung im Follikelepithel spielt, gibt die ektopische Expression von *CF2* mittels eines hitzeschockgetriebenen Transgens. In diesem Fall kommt es zu einer partiellen Ventralisierung der Embryonen; im Gegensatz dazu führt die Expression eines antisense-Konstrukts zur Dorsalisierung von Eikammern und Embryonen (Hsu, Bagni et al. 1996). Wird aber die *pipe-LacZ*-Reporterexpression nach Induktion von *ttk* oder *CF2* loss-of-function Klonen visualisiert, zeigt sich, dass wahrscheinlich beide Gene nicht für die Repression von *pipe* verantwortlich sind (Technau, Knispel et al. 2012).

Die kürzlich identifizierten *IBS*-ähnlichen Bindestellen für Mirror wurden hingegen von keinem einzigen Programm ausgewiesen.

Da das Auffinden bekannter Bindestellen zu einem sehr hohen Maße von den verwendeten Parametern abhängt, selbst durch Anwendung verschiedener Bedingungen nur in wenigen Fällen Übereinstimmungen auftraten sowie viele Vorhersagen sich als falsch positiv erwiesen oder bekannte TF nicht gefunden wurden, kann keine verlässliche Motiv-Vorhersage durch Anwendung von Programmen dieser Art erfolgen.

Möglicherweise kann aber die Kandidatenzahl durch den Nachweis der Transkripte in Follikelzellen mittels *in-situ*-Hybridisierung verkleinert werden, sodass der Einfluss der exprimierten Gene auf die *pipe*-Expression durch RNAi oder *loss-of-function* Klone untersucht werden kann.

4.7 Ein Ets-verwandtes Gen ist möglicherweise an der transkriptionellen Regulation von *pipe* beteiligt

Obwohl die vom EGF-Signalweg regulierten Transkriptionsfaktoren Yan und Pnt nicht direkt an der Regulation von *pipe* beteiligt sind (Technau, Knispel et al. 2012), besteht die Möglichkeit, dass zumindest Yan zusammen mit einem anderen Ets-verwandten Protein die Expression von *pipe* moduliert. In einem postulierten Modell konkurriert das als Repressor charakterisierte Yan mit einem als transkriptionellem Aktivator fungierenden Ets-verwandten Gen um den Zugang zu einer Transkriptionsfaktor-Bindestelle. Die Bindung beider Proteine in der *cis*-regulatorischen Region des Zielgene erfolgt möglicherweise an eine homologe Sequenz mit einem zentralen GGAA/T-Motiv (Sharrocks, Brown et al. 1997).

Die partiell verstärkte Transkription von *pipe* nach Überexpression von konstitutiv aktivem Yan (Yan^{act}) wird möglicherweise durch die anhaltende Repression eines *pipe*-Repressor ausgelöst (siehe Abbildung 4. 1).

Der Mechanismus der kompetitiven Bindung an eine gemeinsame DNA-Sequenz ist beispielsweise für Krüppel und Dorsal (Nibu, Senger et al. 2003) oder die zwei verschiedenen als Aktivator oder Repressor agierenden Protein-Formen von Cubitus interruptus (Ci) nachgewiesen worden (Muller and Basler 2000).

Da *loss-of-function* Klone für *aop* (Yan) und *pnt* im Follikelepithel zu keiner Veränderung des Expressionsmusters des *pipe-LacZ*-Reporters geführt haben, ist wahrscheinlich eines der verbleibenden sechs Ets-verwandten Gene oder ein noch unbekanntes Gen an der Regulation der Repressorexpression beteiligt.

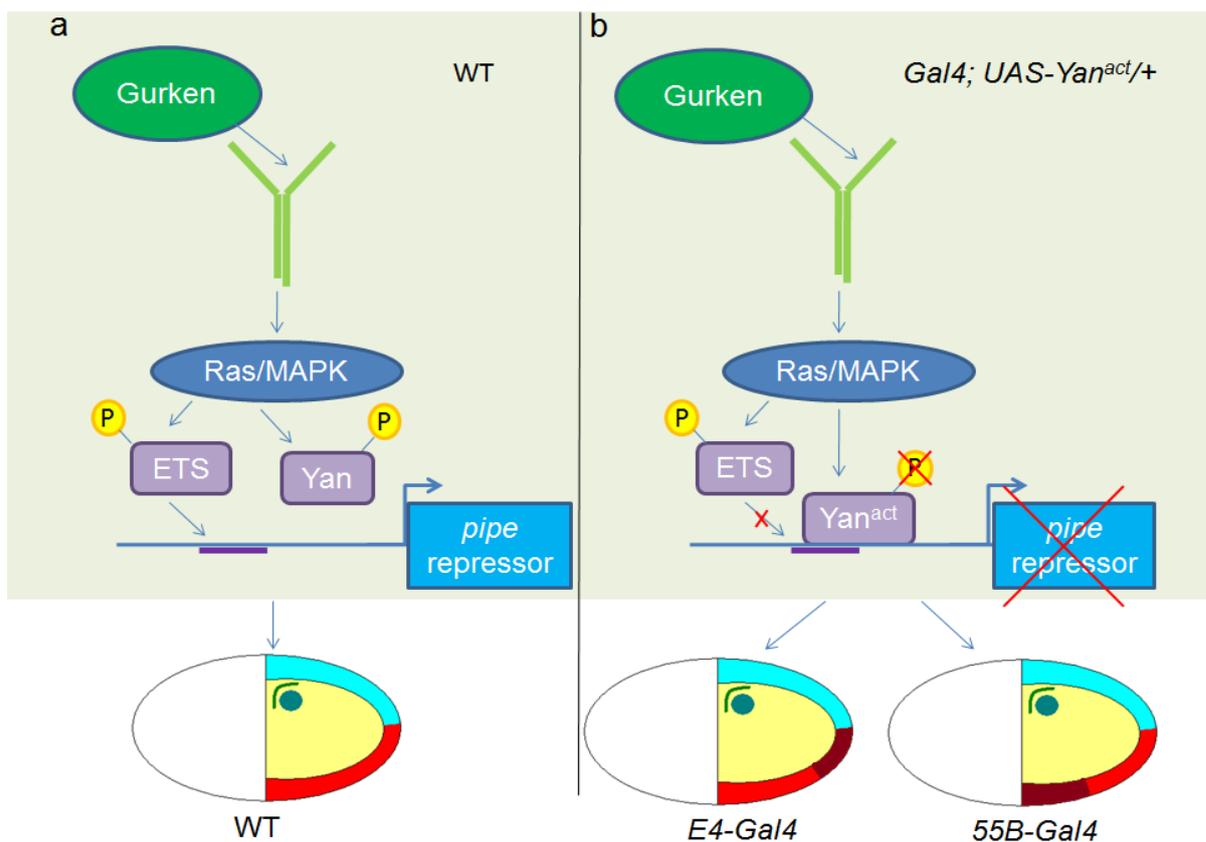


Abbildung 4. 1: Modell der *pipe*-Regulation durch einen ETS-(verwandten) Transkriptionsfaktor
 (a) Im Wildtyp mündet die Aktivierung des EGF-Signalwegs in der Phosphorylierung von Yan und einem ETS-verwandten Protein. Hierdurch wird Yan deaktiviert und aus dem Kern exportiert, während der aktivierte TF nun an die *cis*-regulatorische Sequenz im Promotor des *pipe*-Repressors binden kann. So wird die Expression des Repressors initiiert, welcher die Expressionslevel von *pipe* innerhalb seiner endogenen Domäne reguliert. (b) Konstitutiv aktives Yan (Yan^{act}) kann nicht MAPK-abhängig phosphoryliert werden und blockiert dauerhaft die *cis*-regulatorische Sequenz im Promotor des *pipe*-Repressors. Dieser wird nun nicht mehr exprimiert, was zu einem lokalen Anstieg der *pipe*-Expression in der endogenen ventralen Domäne führt.

Drei Kandidaten, die möglicherweise mit Yan um die Bindung an homologe DNA-Sequenzen konkurrieren, sind *Ets97D*, *Ets65A* und *Eip74EF*. Alle drei werden wie auch *aop* selbst uniform im Follikelepithel exprimiert (vgl. Abb. 3. 9 und (Schulz, Hogue et al. 1993; Schulz, The et al. 1993).

Während der Oogenese in *Ets97D*-mutanten Fliegen werden die *oskar* als auch die *gurken* mRNA nicht mehr korrekt lokalisiert; zusätzlich treten in Ovarien Defekte bezüglich der dorsoventralen Polarität auf (Gajewski and Schulz 1995). Nachkommen dieser mutanten Mütter weisen in vielen Fällen einen ventralisierten Eihüllen-Phänotyp auf, was auf eine mögliche Beteiligung von *Ets97D* Genes an der dorsoventralen Musterbildung hindeutet. In hemizygoten Fliegen kann zudem häufig eine Reduktion der Ovariengröße und der Fertilität sowie das Auftreten fusionierter oder auch nekrotischer Eikammern beobachtet werden (Schulz, Hogue et al. 1993; Schulz, The et al. 1993). Dieser Phänotyp, der insbesondere die

Integrität der Ovarien betrifft, ist mit den in *GR1-Gal4;UASYan^{act}*-Fliegen auftretenden Ovariendefekten vergleichbar und deutet auf *Ets97D* als möglichen Kompetitor von Yan hin. Leider war es nicht möglich die Beteiligung der anderen Kandidaten *Ets65A* und *Eip74EF* an der dorsoventralen Musterbildung genauer zu definieren. Die *pipe*-Expression ist nach Ausschalten der verschiedenen Ets-verwandten Gene durch RNAi in keinem Fall verändert. Entweder hat die Inaktivierung der Gene durch RNAi im Follikelepithel generell nicht funktioniert, da eventuell die falsche Treiberlinie gewählt wurde (Zhu and Stein 2004) oder der „*knock down*“ war nicht effizient, sodass die verbleibenden Proteinlevel, wie zum Beispiel im Fall von Mirror, für die Erfüllung der Genfunktion respektive zur Repression des entsprechenden Zielgens ausgereicht haben.

Um letztendlich zu klären ob und wenn ja, welches der Ets-Gene möglicherweise an der *pipe*-Regulation beteiligt ist, sollte der Einfluss von entsprechenden *loss-of-function* Klonen auf die mRNA-Expression von *pipe* untersucht werden.

Ebenfalls noch ungeklärt ist, welches Gen als postulierter Repressor von einem der Ets-verwandten Gene reguliert werden könnte.

4.8 Funktion und evolutionäre Bedeutung von *pipe*

In *Drosophila melanogaster* hängt die Übertragung der Polarität der dorsoventralen Achse vom Ovar auf den Embryo von einem im Perivitellinspalt asymmetrisch lokalisierten Signal, der ventralen Prozessierung des Toll-Liganden Spätzle, ab. Die Lokalisierung der proteolytischen Kaskade und insbesondere die Bildung des Liganden Spätzle im ventralen Teil des Perivitellinspalts wird durch die Pipe-abhängige Modifikation des Vitelline membrane-like Proteins und weiteren Komponenten der extrazellulären Matrix garantiert (Zhang, Stevens et al. 2009). Pipe ist das einzige Gen, welches von allen am Prozess der Übertragung der Achsenpolarität von der Mutter auf den Embryo beteiligten Komponenten eine asymmetrische Expression aufweist (Sen, Goltz et al. 1998).

Obwohl *pipe* in *D. mel* eine wichtige Rolle im Rahmen der dorsoventralen Musterbildung übernimmt, ist unklar in wie fern seine Funktion innerhalb der Insekten konserviert ist. Die Sequenzkonservierung der *cis*-regulatorischen Region und die Präsenz eines *pipe*-Orthologs in allen zwölf sequenzierten und analysierten *Drosophiliden*-Genomen deuten jedoch darauf hin, dass *pipe* möglicherweise auch in diesen Spezies an der Etablierung der DV-Achse beteiligt ist.

Weitere *pipe*-Orthologe konnten beispielsweise in den Genomen von *Anopheles gambiae*, *Nasonia vitripennis* und *Tribolium castaneum* identifiziert werden (Waterhouse, Zdobnov et al. 2011). Einzig in *Anopheles gambiae* wird *pipe* wie in *Drosophila melanogaster* nur auf der

ventralen Seite der Eikammer exprimiert. In den anderen Organismen konnte bisher keine asymmetrische Expression von *pipe* nachgewiesen werden. Zudem deuten funktionale Analysen mittels RNAi darauf hin, dass *pipe* zumindest in *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum* und *Gryllus bimaculatus* und somit möglicherweise in Insekten außerhalb der Ordnung *Diptera* nicht an der Etablierung der dorsoventralen Achse beteiligt ist (Lynch, Peel et al. 2011).

Mit Ausnahme der *Drosophiliden* wurde in allen Organismen bisher nur eine Pipe-Isoform nachgewiesen, die aber die höchste Ähnlichkeit zu Pipe-ST2 aufweist. Dies deutet an, dass diese Isoform möglicherweise im gemeinsamen Vorfahren präsent war und weitere Isoformen – bis zu elf in *D. mel.* - aus dieser hervorgegangen sind. Diese weiteren Pipe-Isoformen werden alle in den Speicheldrüsen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Strukturen (Zhang, Zhu et al. 2009) während die Expression von Pipe-ST2 in diesem Falle wahrscheinlich nicht notwendig ist.

Ob die *pipe*-Orthologe *Tribolium* oder *Nasonia* gefunden wurden, statt im Ovar in diesen Organismen in den Speicheldrüsen exprimiert werden, ist nicht bekannt. Der fehlende Nachweis einer (asymmetrischen) Expression im Follikelepithel (Lynch, Peel et al. 2011) deutet aber auf eine ancestrale Funktion von *pipe* hin, die nicht mit der dorsoventralen Achsenbildung assoziiert werden kann.

Der Toll-Signalweg wurde im Laufe der Insekten-Evolution für die dorsoventrale Achsenbildung rekrutiert und ist in *Drosophila* die wichtigste Quelle für die Determinierung ventraler und lateraler Zellschicksale. In basaleren Insekten wie *Nasonia* oder *Tribolium* wird neben dem Toll- auch noch der BMP-Signalweg für die Achsenbildung genutzt (Lynch and Roth 2011). Eventuell stellt die Beteiligung von *pipe* an der Übertragung der Achsenpolarität eine sekundäre Funktion dieses Gens dar, die parallel zur Verwendung des Toll-Signalwegs oder abhängig von dessen Rekrutierung für die embryonale DV-Musterbildung evolviert ist.

Es ist wahrscheinlich, dass die Übersetzung des asymmetrischen EGF-Signals im Follikelepithel in die embryonale Musterbildung vieler Insekten, die nicht zu den *Dipteren* gehören, durch einen anderen Mechanismus oder Faktor als *pipe* erfolgt. Möglicherweise ist dieser alternative Faktor in *Nasonia* oder *Tribolium* ein Ortholog zu der in *D. mel.* zusätzlichen zu *pipe* postulierten Quelle einer dorsoventralen Asymmetrie (Zhang, Zhu et al. 2009).

4.9 Ziel der uniformen *pipe*-Expression

Neben der Klärung der transkriptionellen Regulation von *pipe* sollte durch die Deletion essentieller Repressorelemente aus dem *pipe*-Promotor auch die Möglichkeit geschaffen

werden, dieses für die dorsoventrale Achsenbildung essentielle Gen uniform im Follikelepithel zu exprimieren. Die uniforme Expression soll letztlich die Frage klären, wie die embryonale Musterbildung abläuft, wenn zuvor keine initiale Asymmetrie im Follikelepithel respektive Perivitellinspalt etabliert wurde. Die Verwendung des endogenen Promotors würde die Expression auf Wildtyp-Niveau erlauben und potentielle Asymmetrien, die bei Verwendung des UAS/Gal4-Systems aus einer unregelmäßigen Gal4-Treiberaktivität resultieren könnten (Goentoro, Yakoby et al. 2006), vermeiden.

Im Falle der uniformen Expression von *pipe* im Follikelepithel mittels des UAS/Gal4-Systems in *pipe*¹/*pipe*² mutanten Weibchen konnten in Nachkommen eine dorsoventralen Polarität, die bezüglich der Eihülle korrekt orientiert war, identifiziert werden (Zhang, Zhu et al. 2009). Ob diese Polarität nun durch einen sekundären, ventralisierenden Einfluss zu Stande kommt oder durch eine unregelmäßige Treiberexpression bedingt ist, kann hier nicht eindeutig benannt werden.

Die vorwiegende ventrale Präsenz der *snail*-Transkripte in Nachkommen von *pip*^{C14}/*pip*⁶⁸⁴ mutanten Weibchen in denen *UAS-pipST2* mit Hilfe des *Cy2-Gal4*-Treibers bei niedrigen Temperaturen exprimiert wurde, deutet zumindest darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines ventralen Pols auf der konvexen und somit meist „ventralen“ Seite - in Relation zur Form des Embryos – sehr hoch ist. Besonders überraschend ist, dass die schwachen Expression von *pipe* (18°C) die Bildung einer beinahe wildtypischen, bilateral-symmetrischen *sna*-Expressionsdomäne ermöglicht und die betreffenden Embryonen sich häufig zu Adulten entwickeln können. Erst die sehr starke Überexpression von *pipe* mit Hilfe des *Cy2-Gal4*-Treibers bei 29°C oder des 2-3 fach stärkeren *Traffic jam-Gal4*-Treibers (vgl. Abb. A 7) führte zu einer beinahe radialsymmetrischen Expression ventraler und lateraler Markergene im Embryo, die somit vermutlich die Überwindung des ventralisierenden Einflusses reflektieren. Diese Aufhebung der dorsoventralen Polarität findet sich ebenfalls in Nachkommen von Müttern, in deren Follikelepithel *UAS-pipST2* mit einem starken Treiber bei hohen Temperaturen neben endogenem *pipe* exprimiert wurde (vgl. Abb. 3. 26).

Durch die starke Überexpression von *UAS-pipST2* mittels *Traffic jam-Gal4* kann wohlmöglich der postulierte sekundäre, eine Asymmetrie generierende Faktor, überwunden werden und somit eine solch homogene Situation geschaffen werden, dass der Prozess der Musterbildung unabhängig von diesem Faktor in einem symmetrischen Umfeld untersucht werden kann. Insbesondere die Etablierung des Dorsal-Gradienten kann in einer uniformen Umgebung genauer analysiert werden.

4.10 Etablierung des Dorsal-Gradienten entlang der DV-Achse

Die dorsoventrale Polarität des *Drosophila*-Embryos wird vom nukleären Dorsal-Gradienten spezifiziert (Roth, Stein et al. 1989; Rushlow, Han et al. 1989; Stathopoulos and Levine 2002), der wiederum durch den Einfluss des EGFR- und Toll-Signalwegs etabliert wird (Stein 1995; James, Dorman et al. 2002; Peri, Technau et al. 2002). Dieser Gradient besitzt eine charakteristische Form (Roth, Stein et al. 1989; Reeves, Trisnadi et al.), die zwar abhängig von der Menge des produzierten Spätzle-Liganden einer gewissen Variabilität unterliegt, aber immer innerhalb der von *pipe* begrenzten Region repektive den ventralen 40% der embryonalen DV-Achse gebildet wird. Wie genau aber die Form und die Stabilität des Dorsal-Gradienten garantiert werden, ist noch unklar.

Ist die Quelle einer Morphogen-Produktion (Wolpert 1989) räumlich begrenzt während dessen Abbau im gesamten System erfolgt, lässt sich die Bildung eines scharfen Konzentrations-Gradienten durch die Diffusions- und Abbaurate definieren (Bollenbach, Kruse et al. 2005; Wartlick, Kicheva et al. 2009; Rogers and Schier 2011). In diesem Falle lässt sich innerhalb kurzer Zeit die finale Form des Gradienten festlegen.

Bei der Formation des Dorsal-Gradienten kann die Annahme, dass der Aktivator des Toll-Rezeptors, der Spätzle-Ligand, durch Diffusion graduell im Perivitellinspalt verteilt wird, durch *pipe* loss-of-function Klone untermauert werden. Der Verlust der *pipe*-Expression in ventralen Follikelzellen führt neben dem Ausbleiben der ventralen *twist*-Expression auch zum Ausbleiben der lateralen *sog*-Expression im angrenzenden Gewebe (Nilson and Schupbach 1998). Durch die Elimination der räumlich begrenzten Morphogen-produzierenden Quelle werden auch weiter von dieser entfernt liegende Bereiche betroffen; dies deutet somit auf die Diffusion als Mechanismus zur Etablierung des Spätzle- respektive Dorsal-Gradienten hin. Hiermit lässt sich außerdem der Effekt ektopischer *pipe*-Klone im Follikelepithel erklären, die nicht nur zur Expression des ventralen Markergens *snail*, sondern auch zur angrenzenden Expression des lateralen Markergens *rhomboid* führen (vgl. Abb. 3. 32).

Obwohl belegt ist, dass durch die Diffusion eines Aktivators (C-Spz) und dessen daraus resultierende graduelle Verteilung die Spezifizierung verschiedener Zellschicksale entlang der dorsoventralen Achse im Embryo festgelegt werden kann, ist nicht klar, wie der Spätzle-respektive Dorsal-Gradient ausgehend von einer breiten und nicht etwa räumlich begrenzten Produktionsquelle innerhalb einer uniformen (von Pipe etablierten) Umgebung gebildet sowie ohne die Präsenz einer lokalisierten antagonistischen Reaktion aufrecht erhalten wird. In die verschiedenen Musterbildungstheorien zur Etablierung des Dorsal-Gradienten wurde daher neben dem Aktivator- auch ein Inhibitor-Molekül aufgenommen.

4.11 Etablierung des Dorsal-Gradienten durch laterale Inhibition

Um die finale Form des Dorsal-Gradienten im Falle der DV-Achsenbildung im *Drosophila*-Embryo zu erklären, wird die Produktion und Interaktion zweier Substanzen vorausgesetzt. Konkret bedeutet dies, dass innerhalb der von *pipe* modifizierten Region nicht nur ein aktivierender Toll-Ligand (C-Spz), sondern im gleichen Maße auch ein weitreichender Inhibitor (N-Spz) der Toll-Aktivierung gebildet wird (Meinhardt and Gierer 2000; Morisato 2001). Der Inhibitor N-Spz hemmt die Aktivität von C-Spz entweder durch die kompetitive Bindung an den Toll-Rezeptor oder durch die Reassoziierung mit C-Spz.

Diese beiden Moleküle könnten auf Grund unterschiedlicher Diffusionseigenschaften innerhalb einer bestimmten Zeitspanne durch Bildung lokaler Konzentrationsunterschiede den Morphogen-Gradienten entlang der DV-Achse initiieren. Das entstandene Muster wäre zudem über einen langen Zeitraum (mindestens 4-5 Kernteilungszyklen) relativ stabil (Reeves, Trisnadi et al. 2012). Die Beobachtung, dass die Erweiterung der uniformen Produktionsdomäne zu einer Aufspaltung des Dorsal-Maximums führt (Roth and Schupbach 1994, Morisato 2001, Moussian and Roth 2005), gibt ebenfalls Hinweise auf einen Musterbildungsprozess, der neben dem Vorhandensein eines Aktivators auf der Bildung eines Inhibitors beruht und im Zuge der lateralen Inhibition (Gierer and Meinhardt 1972; Meinhardt and Gierer 2000; Meinhardt 2008) verschiedene Toll-Aktivitäts/Dorsal-Maxima generieren könnte.

Zur Etablierung eines stabilen Musters mit Hilfe eines Aktivator-Inhibitor-Modells müssen von den Beteiligten Substanzen zwei Voraussetzungen erfüllt werden. Einerseits wird für die Verstärkung einer zufälligen lokalen Asymmetrie in einer homogenen Umgebung eine positive Rückkopplung (*feedback*) benötigt, d. h. dass der Aktivator nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts seine eigene Produktion fördern kann. Andererseits muss diese Autokatalyse jedoch durch eine antagonistische Reaktion in ihrer Ausdehnung begrenzt werden. Die Bildung dieses notwendigen Antagonisten oder Inhibitors kann unter der Voraussetzung, dass dieser eine höhere Diffusionsrate als der Aktivator besitzt, von dem Aktivator selbst initiiert werden. Die biochemischen Eigenschaften der prozessierten aktivierenden Spz-Fragmente entsprechen zumindest bezüglich ihrer Effekte auf die Toll-Aktivierung den Anforderungen des Modells (Weber, Gangloff et al. 2007).

Eine weitere Möglichkeit die Etablierung eines Aktivator-Maximums im Rahmen der lateralen Inhibition zu erklären, bietet neben dem Aktivator-Inhibitor-Modell mit den Molekülen C-Spz und N-Spz auch ein Substrat-Depletions-Mechanismus (Meinhardt 2004). Diese zwei Modelle müssen sich nicht zwangsläufig ausschließen, sondern könnten die durch sie generierten Muster mutuell stabilisieren. Eine Kombination des Aktivator-Inhibitor- sowie des

Substrat-Depletion-Mechanismus wurde beispielsweise für die Selektion Trichom-bildender Zellen in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen (Bouyer, Geier et al. 2008).

Um die Bildung und Erhaltung eines ventralen Aktivator-Maximums durch den Substrat-Depletions-Mechanismus im *Drosophila*-Embryo zu ermöglichen, müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein. Die Expression von *pipe* muss in einer uniformen Domäne im ventralen Bereich der DV-Achse erfolgen. Gleichzeitig wird ein diffusionsfähiges Substrat von den *pipe*-exprimierenden Zellen sezerniert oder modifiziert. Wird dieses von einer in der ventralen Region ausgelösten Kaskade, die mindestens eine Komponente enthält, die durch positive Rückkopplung wiederum die Aktivität der Protease-Kaskade erhält, umgesetzt, bildet sich im Zentrum der ventralen Region ein Aktivatormaximum. Da die Abnahme der Substratkonzentration mit der Aktivität der Kaskade korreliert, bildet sich entlang der ventralen Mittellinie eine Region, in welcher das Substrat verbraucht wurde. Die Depletion des Substrats in den flankierenden Regionen durch die vermehrte Diffusion ins Zentrum auf Grund des Konzentrationsgefälles kann somit laterale Inhibition verursachen (Gierer and Meinhardt 1972). Möglicherweise fördert die *pipe*-abhängige Modifizierung von verschiedenen EZM-Bestandteilen (beispielsweise VML, Vm26Aa oder Vm32E) die Produktion eines diffusionsfähigen Substrats innerhalb der ventralen Domäne. Vorstellbar wäre, dass dieses im Laufe der Spätzle-Prozessierung von einer Komponente der Protease-Kaskade als Katalysator gebunden wird und die Konzentration somit im dorsalen Perivitellinspalt absinkt.

Die größte Herausforderung bei der Etablierung des Dorsal-Gradienten besteht aber darin, dass dieser nicht nur in eindimensionalen Abschnitten entlang der dorsoventralen Achse, sondern gleichzeitig über die gesamte Länge der anteriorposterioren Achse generiert und stabilisiert werden muss. Im Embryo muss also nicht nur ein punktuell Aktivitäts-Maximum, sondern eine streifenförmige Region höchster Toll-Aktivierung respektive intranukleärer Dorsal-Konzentration etabliert werden.

In den meisten Simulationen ist die Bildung eines stabilen einzelnen Streifens in einer völlig homogenen Umgebung durch laterale Inhibition nicht möglich. Auf Grund der radialen Diffusion des Inhibitors zerfällt ein streifenförmiges Aktivator-Maximum stets in mehrere punktförmige Maxima. Die Verstärkung der lateralen Inhibition, um ein eventuell entstandenes Streifenmuster zu stabilisieren, würde gleichzeitig wiederum dessen Zerfall in einzelne Punkte fördern. Unter bestimmten Bedingungen ist aber auch mit Hilfe des Aktivator-Inhibitor-Modells die Bildung eines Streifens zu erklären und zwar, wenn die autokatalytische Aktivierung des Aktivators und somit auch die Produktion des Inhibitors eine Sättigung erreichen. In diesem Falle können die punktförmigen Regionen, welche eine hohe Aktivator-Präsenz aufweisen, zu einem Streifen fusionieren. Gleichzeitig ist jedoch essentiell,

dass flankierend zur streifenförmigen Aktivator-Domäne stets Regionen ohne Aktivator liegen, in welche der Inhibitor abgeführt oder aus der ein benötigtes Substrat bezogen werden kann (Meinhardt 2004). Diese Bedingung wird im *Drosophila*-Embryo immer dann erfüllt, wenn die Musterbildungsdomäne in ihrer seitlichen Ausdehnung durch die dorsale Repression der *pipe*-Expression begrenzt wird.

Wird die Region der Aktivator-Produktion respektive der Musterbildung jedoch nicht von ausreichend weiten, nicht-aktivierten Bereichen umgeben, wie es in *grk*- oder *egfr*-mutanten Fliegen oder nach uniformer Überexpression von *pipe* der Fall ist, kann die laterale Inhibition die Aufspaltungen der streifenförmigen Domäne innerhalb des vergrößerten Feldes des Musterbildungsprozesses bedingen.

Wird der Aktivator-Inhibitor-Mechanismus als Modell für die Etablierung der ventralen Mittellinie zu Grunde gelegt, kann im Fall der DV-Achsenbildung die Bildung eines *sna*-Expressionsstreifens, der eine hohe intranukleäre Dorsal-Konzentration in ventralen Kernen reflektiert, innerhalb der von *pipe* begrenzten ventralen 40% des Embryos erklärt werden (vgl. Abb. 3. 22 a, b). In Nachkommen von Fliegen, die *pipe* uniform exprimieren oder in denen die von *pipe* modifizierte Region erweitert ist, wird Spz im gesamten respektive in einer weiteren Region des Perivitellinspalt prozessiert. Kommt es hier nun durch Fluktuation der Aktivator (C-Spz)- und Inhibitor (N-Spz)-Konzentration zur Bildung eines Aktivierungsmaximum kann dieses nicht stabilisiert werden. Abhängig von den Diffusionseigenschaften des Inhibitors spaltet sich das ventrale Maximum in mehrere Maxima auf, da die Region, in die der Inhibitor abgeführt werden kann, zu weit entfernt (Abb. 3. 33 b, b') oder nicht vorhanden ist (vgl. Abb. 3. 23, Abb. 3. 25) (Morisato 2001; Moussian and Roth 2005).

Der laterale Inhibitionsprozess, der einen weitreichenden Inhibitor oder ein Substrat und einen sich selbst positiv regulierenden Aktivator erfordert, könnte auch erklären warum ektopische Klone, die in *pipe*-mutanten Fliegen die ektopische Expression ventraler und lateraler Markergene initiieren können (vgl. Abb. 3. 32), im WT-Hintergrund dazu nicht mehr in der Lage sind (vgl. Abb. 3. 35) (Peri, Technau et al. 2002). Außerdem liefert dieses Modell eine Erklärung, wie sich zwei oder mehrere ektopische *pipe*-Klone gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen (vgl. Abb. 3. 34).

4.12 Das „selbst-organisierende“ Transport-Modell (*self-organized shuttling*)

Mitte 2012 wurde als Alternative zum Aktivator-Inhibitor-Modell, das die laterale Inhibition bedingt (Morisato 2001), ein sich „selbst-organisierender“ Inhibitor-vermittelter Transportmechanismus vorgeschlagen (Haskel-Iltah, Ben-Zvi et al. 2012), der zur Produktion eines robusten wie auch stabilen Dorsal-Gradienten beiträgt, da dessen erforderliche Steigung und

Schärfe nur mit Hilfe eines simplen Diffusions-Mechanismus eines kompetitiven Inhibitors innerhalb der Morphogenquelle nicht erreicht werden könne.

Für die Erfüllung des „selbst-organisierende“ Transport-Modells werden folgende Voraussetzungen angenommen: Inaktives, unprozessiertes Pro-Spätzle ist entlang der gesamten embryonalen dorsoventralen Achse uniform verteilt. Prozessiert wird es durch die Protease Easter (Cho, Stevens et al. 2012) nur in der von *pipe* definierten Region, den ventralen 40% des Perivitellinspalts. Durch diese Prozessierung wird eine aktive Form des Toll-Liganden (NC-Spz) gebildet, die den Rezeptor binden kann, wobei die Spaltprodukte noch miteinander assoziiert bleiben (DeLotto and DeLotto 1998; DeLotto, Smith et al. 2001; Weber, Tauszig-Delamasure et al. 2003). Die Bindung des C-Terminus von Spätzle an den Rezeptor führt zur endgültigen Dissoziation des aktivierenden C-Spz und des inhibitorischen N-Spz (Weber, Gangloff et al. 2007). Danach kann jedoch durch die Reassoziaton der beiden Spz-Fragmente erneut ein inaktiver NC-Spz*-Komplex gebildet werden. Besetzte Toll-Rezeptoren werden durch Endozytose internalisiert (Lund, DeLotto et al. 2010) und nach „Recycling“ wieder in die, dem Perivitellinspalt zugewandte, Membran integriert. Die Haupteigenschaften der in diesem postulierten Modell benötigten Faktoren beruhen auf den tatsächlichen, biochemischen Eigenschaften der Moleküle.

Weitere wichtige Voraussetzung für die Musterbildung sind, dass C-Spz nicht frei diffundieren kann, sondern nur in einem Komplex mit N-Spz und dass die Möglichkeit besteht N-Spz zu inaktivieren. Diese Inaktivierung geschieht hauptsächlich im NC-Spz*-Komplex und somit vorwiegend in der von *pipe* begrenzten ventralen Domäne – möglicherweise durch eine der Proteasen Easter oder Snake – wodurch wiederum aktives C-Spz generiert werden kann.

Die systematische Suche nach den richtigen Werten für die Parameter wie Diffusions-, Degradations-, Endozytoseraten usw. sollte eine Lösung des mathematischen Modells ergeben, die einen scharfen sowie robusten Gradient der Toll-Aktivierung garantiert.

Alle konsistenten Lösungen setzen voraus, dass das aktivierende Fragment C-Spz entlang der ventralen Mittellinie aktiv konzentriert wird. Der Gradient der Toll-Aktivierung wird somit nicht durch eine graduelle Inhibition eines uniform präsenten Liganden, sondern durch die Translokation dieses Liganden in das Zentrum der breiten und uniformen Produktionsdomäne, etabliert (Haskel-Ittah, Ben-Zvi et al. 2012). Dies entspräche der Definition eines Transport- (*Shuttling*-) Mechanismus (Eldar, Dorfman et al. 2002; Moussian and Roth 2005), der beispielsweise auch für die Verteilung von Dpp durch Sog nachgewiesen wurde (Eldar, Dorfman et al. 2002; Mizutani, Nie et al. 2005; Shimmi, Umulis et al. 2005; Wang and Ferguson 2005).

Die Translokation des aktiven Liganden C-Spz – der nicht frei diffundieren kann - zur ventralen Mittellinie des Embryos durch den Inhibitor N-Spz erfordert, dass N-Spz selbst in das Zentrum des Musterbildungsfeldes diffundiert. Bedingung hierfür ist die Schaffung eines Konzentrationsgefälles durch eine asymmetrische Produktion des Inhibitors in einer, die ventrale Mittellinie flankierenden, lateralen Domäne.

Möglich wird dies, wenn folgende Dynamik der Gradienten-Bildung angenommen wird: Anfänglich wird der Toll-Aktivitäts-Gradient durch prozessiertes NC-Spz generiert, dessen Form durch einfache Diffusion beschrieben werden kann. In der *pipe*-Domäne führt die Bindung von NC-Spz an Toll zur Dissoziation der Fragmente. Durch die Reassoziaton und Bildung des inaktiven NC-Spz* wird - ebenfalls in der *pipe*-Domäne - die Degradation von N-Spz möglich. Während C-Spz nicht diffundiert und ventral akkumuliert, sinkt hier gleichzeitig die Konzentration von N-Spz. Die Konzentration von C-Spz entlang der Mittellinie bedingt, dass NC-Spz nun vorwiegend lateral an den Toll-Rezeptor bindet, wo N-Spz nun konzentriert freigesetzt wird und so wiederum das *Shuttling* von C-Spz ermöglicht.

Der Dorsal-Gradient kann unter anderem an Hand seiner Steigung (Reeves, Trisnadi et al. 2012) in zwei unterschiedliche Regionen unterteilt werden. Laut Modell könnte der am weitesten ventral gelegen Abschnitt durch das postulierte *Shuttling* und die Bindung von C-Spz an den Toll-Rezeptor gebildet werden, während die ventrolateralen Abschnitte von der Aktivität von NC-Spz abhängen.

Viele postulierte Eigenschaften der in dem theoretischen *Shuttling*-Modell involvierten Moleküle besonders die Reassoziaton der Spz-Fragmente und die Bildung eines inaktiven NC-Spz*-Komplex konnten in *Drosophila* S2-Zellen oder in Embryonen über die Analyse der Expression verschiedener Markergene indirekt bestätigt werden. Als weitere Tests für die Anwendbarkeit des Modells wurde untersucht, ob hiermit die Musterduplikation bei Erweiterung des *pipe*-Expressionsdomäne von 40% auf 80% erklärt werden kann (Morisato 2001; Moussian and Roth 2005). Auch für diesen Fall wurden Parameter gefunden, die zwei Maxima, die durch ein seichtes ventrales Minimum getrennt sind, ergeben. Durch die Eigenschaft des ventralen Minimums – die Dorsal-Konzentration in den Kernen liegt nur gering unter den *twist*- oder *snail*-Schwellenwerten - kann erklärt werden, weshalb in einigen Embryonen keine Achsenduplikation sondern eine Verbreiterung der *twi*- oder *sna*-Expressionsdomäne beobachtet werden kann (Morisato 2001; Moussian and Roth 2005).

Ein großer Kritikpunkt ist, dass das Transport-Modell zwar die Bildung zweier Dorsal-Maxima nach Reduktion der Spz-Konzentration simulieren kann, nicht aber nach Erhöhung der Spätzle-Menge im Embryo (Morisato 2001). Trotzdem ist dieses Modell das Erste, in welchem viele spezifische Charakteristika der an der Musterbildung beteiligten Moleküle in

den zu Grunde liegenden Simulationen berücksichtigt und teilweise auch experimentell bestätigt wurden (Haskel-Ittah, Ben-Zvi et al. 2012).

Neben der Verfehlung die Aufspaltung der Achse nach Erhöhung der Spätzle-Dosis zu simulieren, vertragen sich auch die vom *self-organized shuttling*-Modell vorhergesagten Effekte einer uniformen *pipe*-Expression – die vollständige Lateralisierung der Embryonen – nicht mit den tatsächlichen Beobachtungen in Embryonen.

Laut Transport-Modell bedingt die uniforme *pipe*-Expression und Spz-Prozessierung, dass der Ligand nicht mehr zur ventralen Mittellinie transportiert werden kann und daher eine intermediäre Toll-Aktivierung im gesamten Embryo ausgelöst wird. Das einfache Diffusionsmodell würde hingegen die Ventralisierung der Embryonen voraussagen (Haskel-Ittah, Ben-Zvi et al. 2012).

An Hand der in Kutikula-Phänotypen auftretenden ringförmigen Zähnchenbänder kann zwar eine Lateralisierung von Embryos nach Überexpression von *pipe* bestätigt werden (vgl. Abb. 3. 19b-d) (Sen, Goltz et al. 1998), diese erstreckt sich aber nicht auf den gesamten Eiumfang, was neben der Präsenz von *rhomboid*-Transkripten an der Expression von *snail* erkennbar ist (vgl. Abb. 3. 25 und 3. 27). Die in diesen Fällen asymmetrisch – vorwiegend ventral – etablierte *snail*-Expressionsdomäne expandiert bei steigenden Temperaturen nach lateral, bis sie sich, oft einhergehend mit dem Verlust der Bilateralsymmetrie, aufspaltet.

Die Möglichkeit dieses Symmetriebruchs und der Bildung zweier Maxima in einer homogenen Umgebung wird in den Simulationen des *self-organized shuttling*-Modells zwar erwähnt, wie und ob diese eventuell *pipe*-unabhängig erfolgt, wird jedoch nicht weiter ausgeführt.

Kann die Lateralisierung der Embryonen von Haskel-Ittah in Experimenten durch die uniforme Expression von *rho*, *vnd* oder *sog* noch bestätigt werden kann, so führt selbst die uniforme Expression von *pipe* mit *Cy2-Gal4* bei hohen Temperaturen oder dem noch stärkeren *Traffic jam-Gal4* Treiber in meinem Fall nur selten zur kompletten Lateralisierung (vgl. Abb. 3. 25 und 3. 27). Auch die gezeigte uniforme Expression von Dorsal-GFP auf einem intermediären Niveau in der transversen Sektion (Haskel-Ittah, Ben-Zvi et al. 2012) muss nicht unbedingt die Situation entlang der gesamten anteriorposterioren Achse widerspiegeln. Die Visualisierung der Dorsal-Verteilung mittels Dorsal-Venus lässt einen deutlichen Unterschied zwischen dem anterioren und posterioren Gradienten erkennen (vgl. Abb. 3. 24), der in transversen Schnitten überhaupt nicht, in der lateralen Aufsicht nur schwer (d), dank der Fokussierung auf die Mitte des Embryos aber leicht zu sehen ist (d').

Nur bei starker Überexpression von *pipe* lässt sich tatsächlich eine Lateralisierung, die durch eine uniforme *rhomboid*-Expression reflektiert und das *Shuttling*-Modell vorhergesagt wird, beobachten (vgl. Abb. 3. 27).

Eventuell wohnt der Eihülle selbst ein polarisierender Faktor inne – möglicherweise bedingt die Eiform selbst die Initiierung der Musterbildung auf der ventralen Seite – der erst durch die Überproduktion von Spz überwunden werden kann, wie es bei Verwendung des *Traffic jam-Gal4*-Treibers oder hohen Temperaturen der Fall ist. Überraschenderweise wird in diesen Fällen *snail* entweder in einem Ring im posterioren Drittel (vgl. Abb. 3. 26) oder sogar an beiden embryonalen Polen exprimiert (vgl. Abb. 3. 27). Ob dies wiederum durch eine Drehung der DV-Achse um 90°C in eine Ebene mit der AP-Achse und der für die DV-Achse zuständigen Musterbildungsprozesse zu erklären ist, kann nur durch die Visualisierung des Dorsal-Gradienten genauer bestimmt werden.

Um die Dynamik des Dorsal-Gradienten in Nachkommen von *pipe*-mutanten Müttern und nach uniformer Überexpression zu analysieren, muss Dorsal-Venus auf die Chromosomen, welche die *UASpip^{ST2}pip^{C14}* oder *UASpip^{ST2}pip⁶⁸⁴*-Insertion tragen, rekombiniert werden. Dies böte die Gelegenheit, neben der Etablierung des Dorsal-Gradienten im WT außerdem dessen Formation abhängig von der *pipe*-Expressionsstärke oder der Größe und Position der *pipe*-Expressionsdomäne im lebenden Embryo in Echtzeit zu visualisieren.

5 Literaturverzeichnis

- Aboobaker, A. A., P. Tomancak, N. Patel, G. M. Rubin and E. C. Lai (2005). "Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18017-18022.
- Alvarez, E., I. C. Northwood, F. A. Gonzalez, D. A. Latour, A. Seth, C. Abate, T. Curran and R. J. Davis (1991). "Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase." J Biol Chem **266**(23): 15277-15285.
- Amiri, A. and D. Stein (2002). "Dorsoventral patterning: a direct route from ovary to embryo." Curr Biol **12**(15): R532-534.
- Anderson, K. V., G. Jurgens and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product." Cell **42**(3): 779-789.
- Anderson, K. V. and C. Nusslein-Volhard (1984). "Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA." Nature **311**(5983): 223-227.
- Andreu, M. J., E. Gonzalez-Perez, L. Ajuria, N. Samper, S. Gonzalez-Crespo, S. Campuzano and G. Jimenez (2012). "Mirror represses pipe expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in Drosophila." Development **139**(6): 1110-1114.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.
- Ashburner, M. and J. Roote (2007). "Culture of Drosophila: the laboratory setup." CSH Protoc **2007**: pdb ip34.
- Ashburner, M. and J. Roote (2007). "Maintenance of a Drosophila laboratory: general procedures." CSH Protoc **2007**: pdb ip35.
- Avruch, J., A. Khokhlatchev, J. M. Kyriakis, Z. Luo, G. Tzivion, D. Vavvas and X. F. Zhang (2001). "Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade." Recent Prog Horm Res **56**: 127-155.
- Bar-Sagi, D. and A. Hall (2000). "Ras and Rho GTPases: a family reunion." Cell **103**(2): 227-238.
- Barolo, S., L. A. Carver and J. W. Posakony (2000). "GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in Drosophila." Biotechniques **29**(4): 726, 728, 730, 732.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.
- Bastock, R. and D. St Johnston (2008). "Drosophila oogenesis." Curr Biol **18**(23): R1082-1087.
- Belvin, M. P., Y. Jin and K. V. Anderson (1995). "Cactus protein degradation mediates Drosophila dorsal-ventral signaling." Genes Dev **9**(7): 783-793.
- Bergmann, A., D. Stein, R. Geisler, S. Hagenmaier, B. Schmid, N. Fernandez, B. Schnell and C. Nusslein-Volhard (1996). "A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in Drosophila." Mech Dev **60**(1): 109-123.

- Berman, B. P., B. D. Pfeiffer, T. R. Lavery, S. L. Salzberg, G. M. Rubin, M. B. Eisen and S. E. Celniker (2004). "Computational identification of developmental enhancers: conservation and function of transcription factor binding-site clusters in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura*." Genome Biol **5**(9): R61.
- Bilioni, A., G. Craig, C. Hill and H. McNeill (2005). "Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14671-14676.
- Bischof, J., R. K. Maeda, M. Hediger, F. Karch and K. Basler (2007). "An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3312-3317.
- Bollenbach, T., K. Kruse, P. Pantazis, M. Gonzalez-Gaitan and F. Julicher (2005). "Robust formation of morphogen gradients." Phys Rev Lett **94**(1): 018103.
- Bothma, J. P., M. Levine and A. Boettiger (2010). "Morphogen gradients: limits to signaling or limits to measurement?" Curr Biol **20**(5): R232-234.
- Bouyer, D., F. Geier, F. Kragler, A. Schnittger, M. Pesch, K. Wester, R. Balkunde, J. Timmer, C. Fleck and M. Hulskamp (2008). "Two-dimensional patterning by a trapping/depletion mechanism: the role of TTG1 and GL3 in *Arabidopsis* trichome formation." PLoS Biol **6**(6): e141.
- Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell and S. M. Cohen (2005). "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol **3**(3): e85.
- Brunner, D., K. Ducker, N. Oellers, E. Hafen, H. Scholz and C. Klambt (1994). "The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway." Nature **370**(6488): 386-389.
- Cha, B. J., B. S. Koppetsch and W. E. Theurkauf (2001). "In vivo analysis of *Drosophila* bicoid mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway." Cell **106**(1): 35-46.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.
- Chang, A. J. and D. Morisato (2002). "Regulation of Easter activity is required for shaping the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo." Development **129**(24): 5635-5645.
- Chang, W. L., W. Liou, H. C. Pen, H. Y. Chou, Y. W. Chang, W. H. Li, W. Chiang and L. M. Pai (2008). "The gradient of Gurken, a long-range morphogen, is directly regulated by Cbl-mediated endocytosis." Development **135**(11): 1923-1933.
- Chasan, R. and K. V. Anderson (1989). "The role of easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo." Cell **56**(3): 391-400.
- Chasan, R., Y. Jin and K. V. Anderson (1992). "Activation of the easter zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo." Development **115**(2): 607-616.
- Cherbas, L., A. Willingham, D. Zhang, L. Yang, Y. Zou, B. D. Eads, J. W. Carlson, J. M. Landolin, P. Kapranov, J. Dumais, A. Samsonova, J. H. Choi, J. Roberts, C. A. Davis, H. Tang, M. J. van Baren, S. Ghosh, A. Dobin, K. Bell, W. Lin, L. Langton, M. O. Duff, A. E. Tenney, C. Zaleski, M. R. Brent, R. A. Hoskins, T. C. Kaufman, J. Andrews, B. R. Graveley, N. Perrimon, S. E. Celniker, T. R. Gingeras and P. Cherbas (2011). "The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines." Genome Res **21**(2): 301-314.
- Cho, Y. S., L. M. Stevens, K. J. Sieverman, J. Nguyen and D. Stein (2012). "A ventrally localized protease in the *Drosophila* egg controls embryo dorsoventral polarity." Curr Biol **22**(11): 1013-1018.

- Cho, Y. S., L. M. Stevens and D. Stein (2010). "Pipe-dependent ventral processing of Easter by Snake is the defining step in Drosophila embryo DV axis formation." Curr Biol **20**(12): 1133-1137.
- Ciapponi, L., D. B. Jackson, M. Mlodzik and D. Bohmann (2001). "Drosophila Fos mediates ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites." Genes Dev **15**(12): 1540-1553.
- DeLotto, R., Y. DeLotto, R. Steward and J. Lippincott-Schwartz (2007). "Nucleocytoplasmic shuttling mediates the dynamic maintenance of nuclear Dorsal levels during Drosophila embryogenesis." Development **134**(23): 4233-4241.
- DeLotto, R. and P. Spierer (1986). "A gene required for the specification of dorsal-ventral pattern in Drosophila appears to encode a serine protease." Nature **323**(6090): 688-692.
- DeLotto, Y. and R. DeLotto (1998). "Proteolytic processing of the Drosophila Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity." Mech Dev **72**(1-2): 141-148.
- DeLotto, Y., C. Smith and R. DeLotto (2001). "Multiple isoforms of the Drosophila Spatzle protein are encoded by alternatively spliced maternal mRNAs in the precellular blastoderm embryo." Mol Gen Genet **264**(5): 643-652.
- Deng, W. M. and M. Bownes (1997). "Two signalling pathways specify localised expression of the Broad-Complex in Drosophila eggshell patterning and morphogenesis." Development **124**(22): 4639-4647.
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K. C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oettel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman and B. J. Dickson (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila." Nature **448**(7150): 151-156.
- Dissing, M., H. Giordano and R. DeLotto (2001). "Autoproteolysis and feedback in a protease cascade directing Drosophila dorsal-ventral cell fate." Embo J **20**(10): 2387-2393.
- Doronina, V. A., C. Wu, P. de Felipe, M. S. Sachs, M. D. Ryan and J. D. Brown (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." Mol Cell Biol **28**(13): 4227-4239.
- Drier, E. A. and R. Steward (1997). "The dorsoventral signal transduction pathway and the Rel-like transcription factors in Drosophila." Semin Cancer Biol **8**(2): 83-92.
- Eldar, A., R. Dorfman, D. Weiss, H. Ashe, B. Z. Shilo and N. Barkai (2002). "Robustness of the BMP morphogen gradient in Drosophila embryonic patterning." Nature **419**(6904): 304-308.
- Emberly, E., N. Rajewsky and E. D. Siggia (2003). "Conservation of regulatory elements between two species of Drosophila." BMC Bioinformatics **4**: 57.
- Farre, D., R. Roset, M. Huerta, J. E. Adsuara, L. Rosello, M. M. Alba and X. Messeguer (2003). "Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN." Nucleic Acids Res **31**(13): 3651-3653.
- Filipowicz, W., L. Jaskiewicz, F. A. Kolb and R. S. Pillai (2005). "Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs." Curr Opin Struct Biol **15**(3): 331-341.
- Fish, M. P., A. C. Groth, M. P. Calos and R. Nusse (2007). "Creating transgenic Drosophila by microinjecting the site-specific phiC31 integrase mRNA and a transgene-containing donor plasmid." Nat Protoc **2**(10): 2325-2331.
- Fitzgerald, K. D. and B. L. Semler (2009). "Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus." Biochim Biophys Acta **1789**(9-10): 518-528.

- Francois, V., M. Solloway, J. W. O'Neill, J. Emery and E. Bier (1994). "Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene." *Genes Dev* **8**(21): 2602-2616.
- Freeman, M. (1998). "Complexity of EGF receptor signalling revealed in *Drosophila*." *Curr Opin Genet Dev* **8**(4): 407-411.
- Fuchs, A., L. S. Cheung, E. Charbonnier, S. Y. Shvartsman and G. Pyrowolakis (2012). "Transcriptional interpretation of the EGF receptor signaling gradient." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(5): 1572-1577.
- Gabay, L., H. Scholz, M. Golembo, A. Klaes, B. Z. Shilo and C. Klambt (1996). "EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm." *Development* **122**(11): 3355-3362.
- Gajewski, K. M. and R. A. Schulz (1995). "Requirement of the ETS domain transcription factor D-ELG for egg chamber patterning and development during *Drosophila* oogenesis." *Oncogene* **11**(6): 1033-1040.
- Gaston, K. and P. S. Jayaraman (2003). "Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms." *Cell Mol Life Sci* **60**(4): 721-741.
- Ge, W., Y. W. Chen, R. Weng, S. F. Lim, M. Buescher, R. Zhang and S. M. Cohen (2012). "Overlapping functions of microRNAs in control of apoptosis during *Drosophila* embryogenesis." *Cell Death Differ* **19**(5): 839-846.
- Gierer, A. and H. Meinhardt (1972). "A theory of biological pattern formation." *Kybernetik* **12**(1): 30-39.
- Goentoro, L. A., N. Yakoby, J. Goodhouse, T. Schupbach and S. Y. Shvartsman (2006). "Quantitative analysis of the GAL4/UAS system in *Drosophila* oogenesis." *Genesis* **44**(2): 66-74.
- Goff, D. J., L. A. Nilson and D. Morisato (2001). "Establishment of dorsal-ventral polarity of the *Drosophila* egg requires capicua action in ovarian follicle cells." *Development* **128**(22): 4553-4562.
- Gonzalez-Reyes, A., H. Elliott and D. St Johnston (1995). "Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling." *Nature* **375**(6533): 654-658.
- Gonzalez, M., I. Martin-Ruiz, S. Jimenez, L. Pirone, R. Barrio and J. D. Sutherland (2011). "Generation of stable *Drosophila* cell lines using multicistronic vectors." *Sci Rep* **1**: 75.
- Graveley, B. R., A. N. Brooks, J. W. Carlson, M. O. Duff, J. M. Landolin, L. Yang, C. G. Artieri, M. J. van Baren, N. Boley, B. W. Booth, J. B. Brown, L. Cherbas, C. A. Davis, A. Dobin, R. Li, W. Lin, J. H. Malone, N. R. Mattiuzzo, D. Miller, D. Sturgill, B. B. Tuch, C. Zaleski, D. Zhang, M. Blanchette, S. Dudoit, B. Eads, R. E. Green, A. Hammonds, L. Jiang, P. Kapranov, L. Langton, N. Perrimon, J. E. Sandler, K. H. Wan, A. Willingham, Y. Zhang, Y. Zou, J. Andrews, P. J. Bickel, S. E. Brenner, M. R. Brent, P. Cherbas, T. R. Gingeras, R. A. Hoskins, T. C. Kaufman, B. Oliver and S. E. Celniker (2011). "The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*." *Nature* **471**(7339): 473-479.
- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada and R. Shiekhattar (2006). "MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex." *Methods Mol Biol* **342**: 33-47.
- Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D109-111.
- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A. J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D140-144.

- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen and A. J. Enright (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D154-158.
- Grun, D., Y. L. Wang, D. Langenberger, K. C. Gunsalus and N. Rajewsky (2005). "microRNA target predictions across seven Drosophila species and comparison to mammalian targets." PLoS Comput Biol **1**(1): e13.
- Hashimoto, C., S. Gerttula and K. V. Anderson (1991). "Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial Drosophila embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation." Development **111**(4): 1021-1028.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-279.
- Haskel-Ittah, M., D. Ben-Zvi, M. Branski-Arieli, E. D. Schejter, B. Z. Shilo and N. Barkai (2012). "Self-organized shuttling: generating sharp dorsoventral polarity in the early Drosophila embryo." Cell **150**(5): 1016-1028.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.
- Hebert, D. N. and M. Molinari (2007). "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." Physiol Rev **87**(4): 1377-1408.
- Hennecke, M., M. Kwissa, K. Metzger, A. Oumard, A. Kroger, R. Schirmbeck, J. Reimann and H. Hauser (2001). "Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs." Nucleic Acids Res **29**(16): 3327-3334.
- Hong, C. C. and C. Hashimoto (1995). "An unusual mosaic protein with a protease domain, encoded by the nudel gene, is involved in defining embryonic dorsoventral polarity in Drosophila." Cell **82**(5): 785-794.
- Hong, J. W., D. A. Hendrix, D. Papatsenko and M. S. Levine (2008). "How the Dorsal gradient works: insights from postgenome technologies." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20072-20076.
- Hsu, T., C. Bagni, J. D. Sutherland and F. C. Kafatos (1996). "The transcriptional factor CF2 is a mediator of EGF-R-activated dorsoventral patterning in Drosophila oogenesis." Genes Dev **10**(11): 1411-1421.
- Hsu, T. and R. A. Schulz (2000). "Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism Drosophila." Oncogene **19**(55): 6409-6416.
- 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**(1368): 583-605.
- Hunter, T. (1998). "The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease." Harvey Lect **94**: 81-119.
- Ip, Y. T., R. E. Park, D. Kosman, K. Yazdanbakhsh and M. Levine (1992). "dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo." Genes Dev **6**(8): 1518-1530.
- James, K. E., J. B. Dorman and C. A. Berg (2002). "Mosaic analyses reveal the function of Drosophila Ras in embryonic dorsoventral patterning and dorsal follicle cell morphogenesis." Development **129**(9): 2209-2222.
- Jang, I. H., N. Chosa, S. H. Kim, H. J. Nam, B. Lemaitre, M. Ochiai, Z. Kambris, S. Brun, C. Hashimoto, M. Ashida, P. T. Brey and W. J. Lee (2006). "A Spatzle-processing enzyme required for toll signaling activation in Drosophila innate immunity." Dev Cell **10**(1): 45-55.

- Jang, S. K., H. G. Krausslich, M. J. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg and E. Wimmer (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." *J Virol* **62**(8): 2636-2643.
- Januschke, J., L. Gervais, L. Gillet, G. Keryer, M. Bornens and A. Guichet (2006). "The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the Drosophila oocyte." *Development* **133**(1): 129-139.
- Jiang, J., D. Kosman, Y. T. Ip and M. Levine (1991). "The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early Drosophila embryos." *Genes Dev* **5**(10): 1881-1891.
- Jiang, J. and M. Levine (1993). "Binding affinities and cooperative interactions with bHLH activators delimit threshold responses to the dorsal gradient morphogen." *Cell* **72**(5): 741-752.
- Jimenez, G., A. Guichet, A. Ephrussi and J. Casanova (2000). "Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in Drosophila terminal and dorsoventral patterning." *Genes Dev* **14**(2): 224-231.
- Joazeiro, C. A., S. S. Wing, H. Huang, J. D. Levenson, T. Hunter and Y. C. Liu (1999). "The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase." *Science* **286**(5438): 309-312.
- Jordan, K. C., N. J. Clegg, J. A. Blasi, A. M. Morimoto, J. Sen, D. Stein, H. McNeill, W. M. Deng, M. Tworoger and H. Ruohola-Baker (2000). "The homeobox gene mirror links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through notch activation." *Nat Genet* **24**(4): 429-433.
- Kanodia, J. S., Y. Kim, R. Tomer, Z. Khan, K. Chung, J. D. Storey, H. Lu, P. J. Keller and S. Y. Shvartsman (2011). "A computational statistics approach for estimating the spatial range of morphogen gradients." *Development* **138**(22): 4867-4874.
- Kanodia, J. S., R. Rikhy, Y. Kim, V. K. Lund, R. DeLotto, J. Lippincott-Schwartz and S. Y. Shvartsman (2009). "Dynamics of the Dorsal morphogen gradient." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21707-21712.
- Kheradpour, P., A. Stark, S. Roy and M. Kellis (2007). "Reliable prediction of regulator targets using 12 Drosophila genomes." *Genome Res* **17**(12): 1919-1931.
- 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**(1): 163-176.
- 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., T. J. Goralski, A. P. Mahowald and J. L. Marsh (1998). "The gastrulation defective gene of Drosophila melanogaster is a member of the serine protease superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6819-6824.
- Konsolaki, M. and T. Schupbach (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**(1): 120-131.
- Kosman, D., Y. T. Ip, M. Levine and K. Arora (1991). "Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the Drosophila embryo." *Science* **254**(5028): 118-122.
- Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D152-157.
- Kugler, J. M. and P. Lasko (2009). "Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during Drosophila oogenesis." *Fly (Austin)* **3**(1): 15-28.

- Kulkarni, M. M., M. Booker, S. J. Silver, A. Friedman, P. Hong, N. Perrimon and B. Mathey-Prevot (2006). "Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays." Nat Methods **3**(10): 833-838.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-858.
- Lai, E. C., P. Tomancak, R. W. Williams and G. M. Rubin (2003). "Computational identification of *Drosophila* microRNA genes." Genome Biol **4**(7): R42.
- Lai, Z. C. and G. M. Rubin (1992). "Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the *yan* gene, an ETS domain protein." Cell **70**(4): 609-620.
- Laski, F. A., D. C. Rio and G. M. Rubin (1986). "Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing." Cell **44**(1): 7-19.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (1994). "Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization." Trends Biochem Sci **19**(11): 459-463.
- Leptin, M. (1991). "twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development." Genes Dev **5**(9): 1568-1576.
- Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz and Y. Yarden (1999). "Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1." Mol Cell **4**(6): 1029-1040.
- Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W. Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger and Y. Yarden (1998). "c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor." Genes Dev **12**(23): 3663-3674.
- Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.
- Lieberman, L. M., G. T. Reeves and A. Stathopoulos (2009). "Quantitative imaging of the Dorsal nuclear gradient reveals limitations to threshold-dependent patterning in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22317-22322.
- Lin, H. and A. C. Spradling (1993). "Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria." Dev Biol **159**(1): 140-152.
- Lipshitz, H. D. and C. A. Smibert (2000). "Mechanisms of RNA localization and translational regulation." Curr Opin Genet Dev **10**(5): 476-488.
- Liu, N., M. Landreh, K. Cao, M. Abe, G. J. Hendriks, J. R. Kennerdell, Y. Zhu, L. S. Wang and N. M. Bonini (2012). "The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*." Nature **482**(7386): 519-523.
- Luders, F., H. Segawa, D. Stein, E. M. Selva, N. Perrimon, S. J. Turco and U. Hacker (2003). "Slalom encodes an adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter essential for development in *Drosophila*." Embo J **22**(14): 3635-3644.
- Lund, E. and J. E. Dahlberg (2006). "Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 59-66.
- Lund, V. K., Y. DeLotto and R. DeLotto (2010). "Endocytosis is required for Toll signaling and shaping of the Dorsal/NF-kappaB morphogen gradient during *Drosophila* embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(42): 18028-18033.
- Lynch, J. A., A. D. Peel, A. Drechsler, M. Averof and S. Roth (2011). "EGF signaling and the origin of axial polarity among the insects." Curr Biol **20**(11): 1042-1047.

- Lynch, J. A. and S. Roth (2011). "The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects." Genes Dev **25**(2): 107-118.
- Ma, Q., C. Guo, K. Barnewitz, G. M. Sheldrick, H. D. Soling, I. Uson and D. M. Ferrari (2003). "Crystal structure and functional analysis of Drosophila Wind, a protein-disulfide isomerase-related protein." J Biol Chem **278**(45): 44600-44607.
- Macdonald, S. J. and A. D. Long (2005). "Prospects for identifying functional variation across the genome." Proc Natl Acad Sci U S A **102** **Suppl 1**: 6614-6621.
- Mahony, S., P. E. Auron and P. V. Benos (2007). "DNA familial binding profiles made easy: comparison of various motif alignment and clustering strategies." PLoS Comput Biol **3**(3): e61.
- Mahony, S. and P. V. Benos (2007). "STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W253-258.
- Margolis, J. and A. Spradling (1995). "Identification and behavior of epithelial stem cells in the Drosophila ovary." Development **121**(11): 3797-3807.
- Margolis, J. S., M. Borowsky, C. W. Shim and J. W. Posakony (1994). "A small region surrounding the distal promoter of the hunchback gene directs maternal expression." Dev Biol **163**(2): 381-388.
- Meijer, H. A., M. Bushell, K. Hill, T. W. Gant, A. E. Willis, P. Jones and C. H. de Moor (2007). "A novel method for poly(A) fractionation reveals a large population of mRNAs with a short poly(A) tail in mammalian cells." Nucleic Acids Res **35**(19): e132.
- Meinhardt, H. (2004). "Different strategies for midline formation in bilaterians." Nat Rev Neurosci **5**(6): 502-510.
- Meinhardt, H. (2008). "Models of biological pattern formation: from elementary steps to the organization of embryonic axes." Curr Top Dev Biol **81**: 1-63.
- Meinhardt, H. and A. Gierer (2000). "Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition." Bioessays **22**(8): 753-760.
- Mellroth, P., J. Karlsson, J. Hakansson, N. Schultz, W. E. Goldman and H. Steiner (2005). "Ligand-induced dimerization of Drosophila peptidoglycan recognition proteins in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6455-6460.
- Messeguer, X., R. Escudero, D. Farre, O. Nunez, J. Martinez and M. M. Alba (2002). "PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches." Bioinformatics **18**(2): 333-334.
- Miyake, S., M. L. Lupher, Jr., C. E. Andoniou, N. L. Lill, S. Ota, P. Douillard, N. Rao and H. Band (1997). "The Cbl protooncogene product: from an enigmatic oncogene to center stage of signal transduction." Crit Rev Oncog **8**(2-3): 189-218.
- Mizutani, C. M., Q. Nie, F. Y. Wan, Y. T. Zhang, P. Vilmos, R. Sousa-Neves, E. Bier, J. L. Marsh and A. D. Lander (2005). "Formation of the BMP activity gradient in the Drosophila embryo." Dev Cell **8**(6): 915-924.
- Moffat, J., J. H. Reiling and D. M. Sabatini (2007). "Off-target effects associated with long dsRNAs in Drosophila RNAi screens." Trends Pharmacol Sci **28**(4): 149-151.
- Mokrejs, M., T. Masek, V. Vopalensky, P. Hlubucek, P. Delbos and M. Pospisek (2010). "IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D131-136.
- Morimoto, A. M., K. C. Jordan, K. Tietze, J. S. Britton, E. M. O'Neill and H. Ruohola-Baker (1996). "Pointed, an ETS domain transcription factor, negatively regulates the EGF receptor pathway in Drosophila oogenesis." Development **122**(12): 3745-3754.

- Morisato, D. (2001). "Spatzle regulates the shape of the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo." Development **128**(12): 2309-2319.
- Moses, A. M., D. A. Pollard, D. A. Nix, V. N. Iyer, X. Y. Li, M. D. Biggin and M. B. Eisen (2006). "Large-scale turnover of functional transcription factor binding sites in *Drosophila*." PLoS Comput Biol **2**(10): e130.
- Moussian, B. and S. Roth (2005). "Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient." Curr Biol **15**(21): R887-899.
- Muller, B. and K. Basler (2000). "The repressor and activator forms of Cubitus interruptus control Hedgehog target genes through common generic gli-binding sites." Development **127**(14): 2999-3007.
- Neuman-Silberberg, F. S. and T. Schupbach (1993). "The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein." Cell **75**(1): 165-174.
- Nibu, Y., K. Senger and M. Levine (2003). "CtBP-independent repression in the *Drosophila* embryo." Mol Cell Biol **23**(11): 3990-3999.
- Nilson, L. A. and T. Schupbach (1998). "Localized requirements for *windbeutel* and *pipe* reveal a dorsoventral prepatterning within the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary." Cell **93**(2): 253-262.
- Nilson, L. A. and T. Schupbach (1999). "EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis." Curr Top Dev Biol **44**: 203-243.
- Northwood, I. C., F. A. Gonzalez, M. Wartmann, D. L. Raden and R. J. Davis (1991). "Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669." J Biol Chem **266**(23): 15266-15276.
- O'Neill, E. M., I. Rebay, R. Tjian and G. M. Rubin (1994). "The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway." Cell **78**(1): 137-147.
- Pai, L. M., G. Barcelo and T. Schupbach (2000). "D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis." Cell **103**(1): 51-61.
- Pan, D. J., J. D. Huang and A. J. Courey (1991). "Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region." Genes Dev **5**(10): 1892-1901.
- Park, Y., Z. Zhang, R. J. Linhardt and E. K. LeMosy (2008). "Distinct heparan sulfate compositions in wild-type and *pipe*-mutant eggshell matrix." Fly (Austin) **2**(4): 175-179.
- Pascucci, T., J. Perrino, A. P. Mahowald and G. L. Waring (1996). "Eggshell assembly in *Drosophila*: processing and localization of vitelline membrane and chorion proteins." Dev Biol **177**(2): 590-598.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-325.
- Peri, F., C. Bokel and S. Roth (1999). "Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis." Mech Dev **81**(1-2): 75-88.
- Peri, F., M. Technau and S. Roth (2002). "Mechanisms of Gurken-dependent *pipe* regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*." Development **129**(12): 2965-2975.
- Poulton, J. S. and W. M. Deng (2007). "Cell-cell communication and axis specification in the *Drosophila* oocyte." Dev Biol **311**(1): 1-10.

- Price, J. V., R. J. Clifford and T. Schupbach (1989). "The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the Drosophila EGF receptor homolog." *Cell* **56**(6): 1085-1092.
- Queenan, A. M., A. Ghabrial and T. Schupbach (1997). "Ectopic activation of torpedo/Egfr, a Drosophila receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo." *Development* **124**(19): 3871-3880.
- Rabouille, C., D. A. Kuntz, A. Lockyer, R. Watson, T. Signorelli, D. R. Rose, M. van den Heuvel and D. B. Roberts (1999). "The Drosophila GMII gene encodes a Golgi alpha-mannosidase II." *J Cell Sci* **112** (Pt 19): 3319-3330.
- Rana, T. M. (2007). "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 23-36.
- Reach, M., R. L. Galindo, P. Towb, J. L. Allen, M. Karin and S. A. Wasserman (1996). "A gradient of cactus protein degradation establishes dorsoventral polarity in the Drosophila embryo." *Dev Biol* **180**(1): 353-364.
- Read, D. and J. L. Manley (1992). "Alternatively spliced transcripts of the Drosophila tramtrack gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities." *Embo J* **11**(3): 1035-1044.
- Rebay, I. and G. M. Rubin (1995). "Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway." *Cell* **81**(6): 857-866.
- Reeves, G. T., N. Trisnadi, T. V. Truong, M. Nahmad, S. Katz and A. Stathopoulos (2012). "Dorsal-ventral gene expression in the Drosophila embryo reflects the dynamics and precision of the dorsal nuclear gradient." *Dev Cell* **22**(3): 544-557.
- Reich, J., M. J. Snee and P. M. Macdonald (2009). "miRNA-dependent translational repression in the Drosophila ovary." *PLoS One* **4**(3): e4669.
- Ripoche, J., B. Link, J. K. Yucel, K. Tokuyasu and V. Malhotra (1994). "Location of Golgi membranes with reference to dividing nuclei in syncytial Drosophila embryos." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1878-1882.
- Robinson, D. N. and L. Cooley (1996). "Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel." *Trends Cell Biol* **6**(12): 474-479.
- Roch, F., G. Jimenez and J. Casanova (2002). "EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of Drosophila wing veins." *Development* **129**(4): 993-1002.
- Rogers, K. W. and A. F. Schier (2011). "Morphogen gradients: from generation to interpretation." *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 377-407.
- Rohrbaugh, M., E. Ramos, D. Nguyen, M. Price, Y. Wen and Z. C. Lai (2002). "Notch activation of yan expression is antagonized by RTK/pointed signaling in the Drosophila eye." *Curr Biol* **12**(7): 576-581.
- Roth, S. (1993). "Mechanisms of dorsal-ventral axis determination in Drosophila embryos revealed by cytoplasmic transplantations." *Development* **117**(4): 1385-1396.
- Roth, S. (1994). "Axis determination. Proteolytic generation of a morphogen." *Curr Biol* **4**(8): 755-757.
- Roth, S. (2003). "The origin of dorsoventral polarity in Drosophila." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1436): 1317-1329; discussion 1329.
- Roth, S. and J. A. Lynch (2009). "Symmetry breaking during Drosophila oogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(2): a001891.
- Roth, S. and T. Schupbach (1994). "The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in Drosophila." *Development* **120**(8): 2245-2257.

- Roth, S., D. Stein and C. Nusslein-Volhard (1989). "A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo." Cell **59**(6): 1189-1202.
- Rubin, G. M., T. Hazelrigg, R. E. Karess, F. A. Laski, T. Laverty, R. Levis, D. C. Rio, F. A. Spencer and C. S. Zuker (1985). "Germ line specificity of P-element transposition and some novel patterns of expression of transduced copies of the white gene." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **50**: 329-335.
- Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-353.
- Ruby, J. G., A. Stark, W. K. Johnston, M. Kellis, D. P. Bartel and E. C. Lai (2007). "Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs." Genome Res **17**(12): 1850-1864.
- Rushlow, C., H. Doyle, T. Hoey and M. Levine (1987). "Molecular characterization of the *zerknüllt* region of the Antennapedia gene complex in *Drosophila*." Genes Dev **1**(10): 1268-1279.
- Rushlow, C., M. Frasch, H. Doyle and M. Levine (1987). "Maternal regulation of *zerknüllt*: a homoeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in *Drosophila*." Nature **330**(6148): 583-586.
- Rushlow, C. and M. Levine (1990). "Role of the *zerknüllt* gene in dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*." Adv Genet **27**: 277-307.
- Rushlow, C. A., K. Han, J. L. Manley and M. Levine (1989). "The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*." Cell **59**(6): 1165-1177.
- Saito, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2005). "Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells." PLoS Biol **3**(7): e235.
- Saiz, L. and J. M. Vilar (2008). "Protein-protein/DNA interaction networks: versatile macromolecular structures for the control of gene expression." IET Syst Biol **2**(5): 247-255.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.
- Schlessinger, J. (2000). "New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis." Cell **100**(3): 293-296.
- Schlessinger, J., A. Ullrich, A. M. Honegger and W. H. Moolenaar (1988). "Signal transduction by epidermal growth factor receptor." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **53 Pt 1**: 515-519.
- Schneider, D. S., K. L. Hudson, T. Y. Lin and K. V. Anderson (1991). "Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo." Genes Dev **5**(5): 797-807.
- Schneider, D. S., Y. Jin, D. Morisato and K. V. Anderson (1994). "A processed form of the Spatzle protein defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo." Development **120**(5): 1243-1250.
- Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." J Embryol Exp Morphol **27**(2): 353-365.
- Schulz, R. A., D. A. Hogue and S. M. The (1993). "Characterization of lethal alleles of D-*elg*, an *ets* proto-oncogene related gene with multiple functions in *Drosophila* development." Oncogene **8**(12): 3369-3374.

- Schulz, R. A., S. M. The, D. A. Hogue, S. Galewsky and Q. Guo (1993). "Ets oncogene-related gene Elg functions in Drosophila oogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10076-10080.
- Schubach, T. (1987). "Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in Drosophila melanogaster." Cell **49**(5): 699-707.
- Schubach, T. (2009). "Developmental biology: Pipe's smoking guns." Curr Biol **19**(14): R548-550.
- Seinen, E., J. G. Burgerhof, R. C. Jansen and O. C. Sibon (2010). "RNAi experiments in D. melanogaster: solutions to the overlooked problem of off-targets shared by independent dsRNAs." PLoS One **5**(10).
- Seinen, E., J. G. Burgerhof, R. C. Jansen and O. C. Sibon (2011). "RNAi-induced off-target effects in Drosophila melanogaster: frequencies and solutions." Brief Funct Genomics **10**(4): 206-214.
- Sen, J., J. S. Goltz, M. Konsolaki, T. Schubach and D. Stein (2000). "Windbeutel is required for function and correct subcellular localization of the Drosophila patterning protein Pipe." Development **127**(24): 5541-5550.
- Sen, J., J. S. Goltz, L. Stevens and D. Stein (1998). "Spatially restricted expression of pipe in the Drosophila egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity." Cell **95**(4): 471-481.
- Sergeev, P., A. Streit, A. Heller and M. Steinmann-Zwicky (2001). "The Drosophila dorsoventral determinant PIPE contains ten copies of a variable domain homologous to mammalian heparan sulfate 2-sulfotransferase." Dev Dyn **220**(2): 122-132.
- Sharrocks, A. D., A. L. Brown, Y. Ling and P. R. Yates (1997). "The ETS-domain transcription factor family." Int J Biochem Cell Biol **29**(12): 1371-1387.
- Shea, M. J., D. L. King, M. J. Conboy, B. D. Mariani and F. C. Kafatos (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**(7): 1128-1140.
- Shevchuk, N. A., A. V. Bryksin, Y. A. Nusinovich, F. C. Cabello, M. Sutherland and S. Ladisch (2004). "Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously." Nucleic Acids Res **32**(2): e19.
- Shima, D. T., K. Haldar, R. Pepperkok, R. Watson and G. Warren (1997). "Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells." J Cell Biol **137**(6): 1211-1228.
- Shimmi, O., D. Umulis, H. Othmer and M. B. O'Connor (2005). "Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the Drosophila blastoderm embryo." Cell **120**(6): 873-886.
- Siepel, A., G. Bejerano, J. S. Pedersen, A. S. Hinrichs, M. Hou, K. Rosenbloom, H. Clawson, J. Spieth, L. W. Hillier, S. Richards, G. M. Weinstock, R. K. Wilson, R. A. Gibbs, W. J. Kent, W. Miller and D. Haussler (2005). "Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes." Genome Res **15**(8): 1034-1050.
- Spradling, A., M. T. Fuller, R. E. Braun and S. Yoshida (2011). "Germline stem cells." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(11): a002642.
- St Johnston, D. (2001). "The beginning of the end." The EMBO Journal **20**(22): 6169 - 6179.
- Stathopoulos, A. and M. Levine (2002). "Dorsal gradient networks in the Drosophila embryo." Dev Biol **246**(1): 57-67.
- Stein, D. (1995). "Pattern formation: The link between ovary and embryo." Curr Biol **5**(12): 1360-1363.

- Stein, D., I. Charatsi, Y. S. Cho, Z. Zhang, J. Nguyen, R. DeLotto, S. Luschnig and B. Moussian (2010). "Localization and activation of the Drosophila protease easter require the ER-resident saposin-like protein seele." Curr Biol **20**(21): 1953-1958.
- Stein, D., Y. S. Cho, Z. Zhang and L. M. Stevens (2008). "No requirement for localized Nudel protein expression in Drosophila embryonic axis determination." Fly (Austin) **2**(4): 220-228.
- Stein, D., S. Roth, E. Vogelsang and C. Nusslein-Volhard (1991). "The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal." Cell **65**(5): 725-735.
- Steward, R., F. J. McNally and P. Schedl (1984). "Isolation of the dorsal locus of Drosophila." Nature **311**(5983): 262-265.
- Technau, M., M. Knispel and S. Roth (2012). "Molecular mechanisms of EGF signaling-dependent regulation of pipe, a gene crucial for dorsoventral axis formation in Drosophila." Dev Genes Evol **222**(1): 1-17.
- Thio, G. L., R. P. Ray, G. Barcelo and T. Schupbach (2000). "Localization of gurken RNA in Drosophila oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript." Dev Biol **221**(2): 435-446.
- Thisse, B., C. Stoetzel, C. Gorostiza-Thisse and F. Perrin-Schmitt (1988). "Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos." Embo J **7**(7): 2175-2183.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (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**(22): 4673-4680.
- Thummel, C. S., A. M. Boulet and H. D. Lipshitz (1988). "Vectors for Drosophila P-element-mediated transformation and tissue culture transfection." Gene **74**(2): 445-456.
- Tootle, T. L. and I. Rebay (2005). "Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily." Bioessays **27**(3): 285-298.
- Wang, Y. C. and E. L. Ferguson (2005). "Spatial bistability of Dpp-receptor interactions during Drosophila dorsal-ventral patterning." Nature **434**(7030): 229-234.
- Wartlick, O., A. Kicheva and M. Gonzalez-Gaitan (2009). "Morphogen gradient formation." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(3): a001255.
- Waterhouse, R. M., E. M. Zdobnov, F. Tegenfeldt, J. Li and E. V. Kriventseva (2011). "OrthoDB: the hierarchical catalog of eukaryotic orthologs in 2011." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D283-288.
- Weber, A. N., M. Gangloff, M. C. Moncrieffe, Y. Hyvert, J. L. Imler and N. J. Gay (2007). "Role of the Spatzle Pro-domain in the generation of an active toll receptor ligand." J Biol Chem **282**(18): 13522-13531.
- Weber, A. N., M. C. Moncrieffe, M. Gangloff, J. L. Imler and N. J. Gay (2005). "Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway." J Biol Chem **280**(24): 22793-22799.
- Weber, A. N., S. Tauszig-Delamasure, J. A. Hoffmann, E. Lelievre, H. Gascan, K. P. Ray, M. A. Morse, J. L. Imler and N. J. Gay (2003). "Binding of the Drosophila cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling." Nat Immunol **4**(8): 794-800.
- Weng, R. and S. M. Cohen (2012). "Drosophila miR-124 regulates neuroblast proliferation through its target anachronism." Development **139**(8): 1427-1434.

- Wienholds, E. and R. H. Plasterk (2005). "MicroRNA function in animal development." FEBS Lett **579**(26): 5911-5922.
- Wingender, E., P. Dietze, H. Karas and R. Knuppel (1996). "TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites." Nucleic Acids Res **24**(1): 238-241.
- Wittkopp, P. J. (2006). "Evolution of cis-regulatory sequence and function in Diptera." Heredity (Edinb) **97**(3): 139-147.
- Wolpert, L. (1989). "Positional information revisited." Development **107 Suppl**: 3-12.
- Xu, P., S. Y. Vernooy, M. Guo and B. A. Hay (2003). "The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism." Curr Biol **13**(9): 790-795.
- Yang, Y., S. Xu, L. Xia, J. Wang, S. Wen, P. Jin and D. Chen (2009). "The bantam microRNA is associated with drosophila fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells." PLoS Genet **5**(4): e1000444.
- Yarden, Y. and A. Ullrich (1988). "Growth factor receptor tyrosine kinases." Annu Rev Biochem **57**: 443-478.
- Yokouchi, M., T. Kondo, A. Houghton, M. Bartkiewicz, W. C. Horne, H. Zhang, A. Yoshimura and R. Baron (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**(44): 31707-31712.
- Zarich, N., J. L. Oliva, N. Martinez, R. Jorge, A. Ballester, S. Gutierrez-Eisman, S. Garcia-Vargas and J. M. Rojas (2006). "Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1." Mol Biol Cell **17**(8): 3591-3597.
- Zhang, R. and B. Su (2009). "Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution." J Genet Genomics **36**(1): 1-6.
- Zhang, Y., J. H. Malone, S. K. Powell, V. Periwal, E. Spana, D. M. Macalpine and B. Oliver (2010). "Expression in aneuploid Drosophila S2 cells." PLoS Biol **8**(2): e1000320.
- Zhang, Z., L. M. Stevens and D. Stein (2009). "Sulfation of eggshell components by Pipe defines dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo." Curr Biol **19**(14): 1200-1205.
- Zhang, Z., X. Zhu, L. M. Stevens and D. Stein (2009). "Distinct functional specificities are associated with protein isoforms encoded by the Drosophila dorsal-ventral patterning gene pipe." Development **136**(16): 2779-2789.
- Zhao, D., S. Woolner and M. Bownes (2000). "The Mirror transcription factor links signalling pathways in Drosophila oogenesis." Dev Genes Evol **210**(8-9): 449-457.
- Zhao, T., O. S. Graham, A. Raposo and D. St Johnston (2012). "Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the Drosophila dorsal-ventral axis." Science **336**(6084): 999-1003.
- Zhu, X., J. Sen, L. Stevens, J. S. Goltz and D. Stein (2005). "Drosophila pipe protein activity in the ovary and the embryonic salivary gland does not require heparan sulfate glycosaminoglycans." Development **132**(17): 3813-3822.
- Zhu, X. and D. Stein (2004). "RNAi-mediated inhibition of gene function in the follicle cell layer of the Drosophila ovary." Genesis **40**(2): 101-108.

6 Anhang

RNAi-Phänotypen

Die Abbildung A 1 zeigt die Auswirkung der uniformen Überexpression der RNAi-Konstrukte zum „knock down“ von *D-ets-6*, *D-ets-4* und *Ets65A* im Follikelepithel auf die dorsalen Anhänge. Möglicherweise ist eines oder mehrere Ets-verwandte Gene neben *pnt* an der Musterbildung im Follikelepithel zur Spezifizierung der für diese Strukturen benötigten Zellen beteiligt (Morimoto, Jordan et al. 1996; Deng and Bownes 1997).

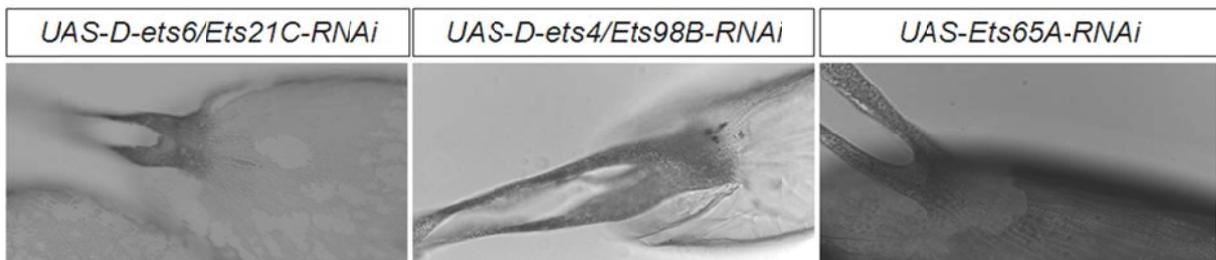


Abbildung A 1: Auswirkung der Überexpression von *UAS-RNAi-D-ets-6*, *UAS-D-ets-4* und *UAS-Ets65A-RNAi* Der Eihüllen-Phänotyp zeigt eine Fusion der Basis der dorsalen Anhänge.

Ergebnisse der microRNA-Datenbankabfragen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der microRNA Datenbankabfragen, welche im Ergebnisteil in Tabelle 3.1 aufgeführt sind, noch einmal detailliert dargestellt.

Die in MICROCOSM aufgeführten sechs miRNAs wurden alle für die späteren Analysen ausgewählt (Abbildung A 2). Alle microRNA-Transkripte waren bereits annotiert, zudem konnte die Präsenz von Primär-Transkripten in Embryonen für die miRNAs *mir-8*, *mir-11* und *mir-283* bereits mittels *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden.

Rfam ID	Score	Energy	Base P	Poisson P	Org P	Start	End	Alignment
dme-miR-79	19.0602	-13.53	7.762160e-03	7.732110e-03	7.732110e-03	234	255	<pre> ACGAAACCAUUAGAUCGAAAU :: : TGGTTTAGTATTTTATGTTTAA </pre>
dme-miR-11	17.703	-20.9	1.094070e-02	1.088110e-02	1.088110e-02	189	209	<pre> CUUGAGUCUGACACUAC :: : : GAGTTTGAATTGTGATG </pre>
dme-bantam	17.3025	-13.9	2.530110e-02	2.498370e-02	2.498370e-02	308	329	<pre> UAGUCGAAAGUUUACUAGAGU :: : ATTGTCCTTC-CACTGATTCA </pre>
dme-miR-8	16.748	-11.19	3.366050e-02	3.310030e-02	3.310030e-02	227	247	<pre> CUGUAGAAAUGGACUGUCAUAA : : : GAAATTTTGGTT--TAGTATT </pre>
dme-miR-33	16.5825	-17.58	4.558190e-02	4.455870e-02	4.455870e-02	131	149	<pre> UUACGCUGAUGUUACUGGA : : AATATGAC-A-AATGCATCT </pre>
dme-miR-306	16.3851	-16.06	2.869180e-02	2.828410e-02	2.828410e-02	158	178	<pre> UCUCAGUGAUUCAUGGA : AGA-TTAGTAAGTACCT </pre>

Abbildung A 2: Darstellung der vorhergesagten *pipe* 3'-UTR bindenden microRNA-Kandidaten nach Abfrage der MICROCOSM (EMBL-EBI)-Datenbank Für die sechs microRNAs, die an die 3'-UTR von *pipe* binden könnten, werden *Score*, *Energy* und verschiedene *P-values* angegeben. Der *Score* setzt sich aus der Summe verschiedener Scores zusammen, die für Komplementarität, Mismatches und Gaps vergeben werden. Die *Energy* ist ein Maß für die thermodynamische Stabilität der miRNA:RNA-Duplex. *Base P* ist auf der Grundlage der Verteilungsparameter abhängig vom genomischen Hintergrund der mirRanda-Scores berechnet. *Poisson P* gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein einzelnes Transkript mehr als einen signifikanten Treffer (Bindestelle) enthält. *Org P* gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine microRNA-Familie auch Transkripte weiterer Spezies einer orthologen Gruppe bindet. Zudem wird ein Alignment der microRNA mit der Ziel-Sequenz samt Start- und Endpositionen innerhalb der 3'-UTR angezeigt.

Im Gegensatz zu den sieben in MICROCOSM aufgeführten microRNAs wurden in der TargetScanFly-Datenbank nur vier microRNAs, die an fünf Positionen innerhalb der *pipe* 3'-UTR binden können aufgeführt (Abbildung A 3). Zudem sind diese alle nur als schwach konserviert klassifiziert. Die miRNA *mir-283* ist auch in der MICROCOSM-Datenbank als *pipe*-3'-UTR bindender Kandidat präsent, während *mir-190*, *mir-1013* und *mir-979* nur von TargetScanFly aufgeführt werden. Zudem war zum Zeitpunkt der Abfrage für letztere drei noch kein Transkript annotiert, sodass diese microRNAs nicht für detailliertere Einzeluntersuchungen (Expressionsmuster) berücksichtigt wurden.

PicTar score for dme-miR-11: 2.75 Mel-subgroup: 3.02 Ana: 2.82 Pse: 2.42 Moj-Vir: 2.56

Org	PicTar score	PicTar score per species	microRNA	Probabilities	Nuclei mapped to alignments	Nuclei mapped to sequence	Free Energies kcal/mol
Mel	2.75	3.01	dme-miR-11	0.95	337	206	-20.5
Yak	2.75	3.04	dme-miR-11	0.95	337	203	-20.5
Ana	2.75	2.82	dme-miR-11	0.94	337	239	-20.4
Pse	2.75	2.42	dme-miR-11	0.91	337	217	-23.2
Vir	2.75	2.80	dme-miR-11	0.94	337	237	-19.2
Moj	2.75	2.31	dme-miR-11	0.90	337	251	-21.0

Structure of predicted duplex			
AAGA CU AG	AUUGUGAUG :	UUCU GA UC	UGACACUAC
AAGA CU AG	AUUGUGAUG :	UUCU GA UC	UGACACUAC
GAAUUU AUUGUGAUG :	CUUGAG	UGACACUAC	
GAAUUCG AUUGUGAUG :	CUUGAGU	UGACACUAC	
GCA UUCG AUUGUGAUG :	CGU	GAGU UGACACUAC	
GAGA AUUCG AUUGUGAUG :	UUCU	UGAGU UGACACUAC	

TATAAAGACCTGAGTTTGAATTGTG---- <td>320</td> <td>330</td> <td>340</td> <td>350</td> <td>360</td>	320	330	340	350	360
TATAAAGACCTGAGTTTGAATTGTG---- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>					
TAGAATGACCTGAATTTGAATTGTG---- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>					
TAGAAAGACCTGAATTCGAATTGTG---- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>					
TATAAAAAA-TGCATTCGAATTGTG---- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>					
TATGAGAAACTGCATTCGAATTGTG---- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>					

Abbildung A 4: Darstellung des vorhergesagten *pipe* 3'-UTR bindenden microRNA-Kandidaten *mir-11* nach Abfrage der PicTar-Datenbank Von den vier microRNAs, auf der PicTar-Datenbank aufgeführt wurden, ist die Datenausgabe als Beispiel für *mir-11* dargestellt. Zu den *seed matches* (gelb unterlegt) in der 3'-UTR ist die Struktur der vorhergesagten miRNA:RNA Duplex dargestellt. Außerdem sind die freie Energie sowie die *PicTar scores* (Grun, Wang et al. 2005) für verschiedene *Drosophiliden* angegeben.

Um eine mögliche Beteiligung der verschiedenen miRNAs an der post-transkriptionellen Regulation von *pipe* zu untersuchen, wurde deren Expression im Follikel epithel mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Abbildung A 4 zeigt die Expressionsmuster von *mir-11* und *mir-315* in Embryonen, die zwar als potentielle Kandidaten vorhergesagt waren, deren Expression im Follikel epithel aber nicht nachgewiesen werden konnte.

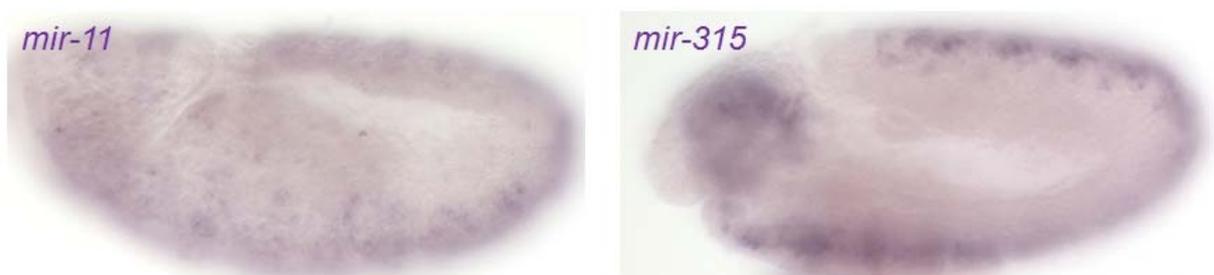


Abbildung A 5: Expression von *mir-11* und *mir-315* in Embryonen *in-situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-gekoppelten Sonden zur Visualisierung der Transkripte von *mir-11* und *mir-315* in Embryonen während der Gastrulation.

Reporterepression nach Verschiebung des *Motiv B*

Das Repressorelement *Motiv B* ist notwendig für die dorsale Repression von *pipe*. Die Deletion dieses cis-regulatorischen Elements, welches vom Transkriptionsfaktor Mirror gebunden werden kann, führt zu einer Expansion der *pipe*-Expression im Follikelepithel. Obwohl die Notwendigkeit dieses Elements für die transkriptionelle Regulation von *pipe* nachgewiesen ist, kann nicht darauf geschlossen werden, dass es auch ausreicht, um die dorsale Repression von *pipe* zu vermitteln.

Um dies zu testen, wurde das Repressorelement *Motiv B* aus seiner ursprünglichen Position im *pipe*-Promotor deletiert und an andere Stellen wieder integriert. Zudem wurde auch die Orientierung verändert. Die anschließend zu beobachtende ausbleibende dorsale Repression des *LacZ*-Reporters im Follikelepithel transgener Fliegen deutet darauf hin, dass diese Repressorelement nicht alleine für die dorsale Repression von *pipe* verantwortlich ist. Diese Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse der in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Zellkultur-Experimente bestätigt.

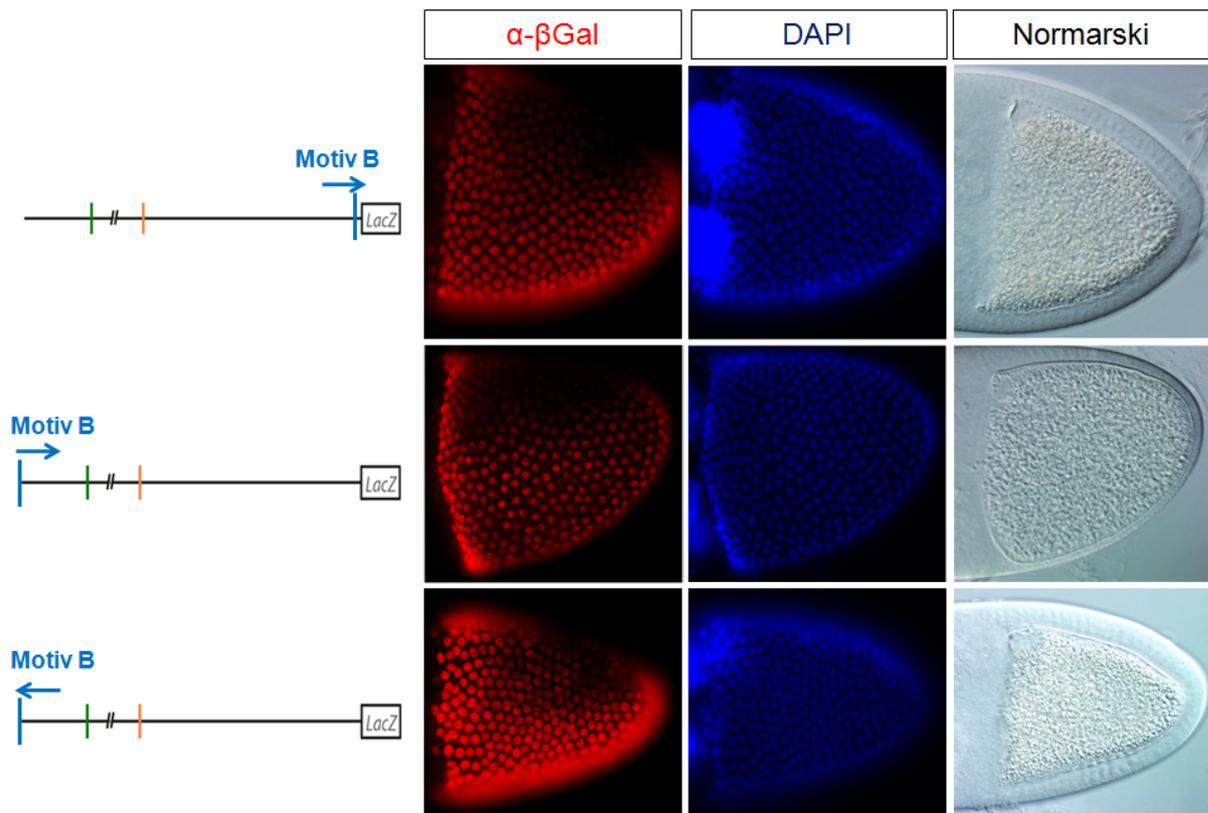


Abbildung A 6: Übersicht über die analysierten *pipe*-Promotor-Konstrukte sowie die Expressionsmuster Lateralansicht von Eikammern im Stadium 10 A, die mit dem anterioren Ende nach links sowie der dorsalen Seite nach oben orientiert sind. Die erste Spalte zeigt jeweils das durch eine anti- β -Gal Antikörperfärbung sichtbar gemachte Expressionsmuster des Reportergens unter Kontrolle der links schematisierten Promotorkonstrukte. Die zweite Spalte zeigt an Hand einer DAPI-Färbung die Unversehrtheit des Follikelepithels. Die dritte Spalte zeigt an Hand von Normarski-Aufnahmen die dorsale Lokalisation des Oozytenkerns.

Detaillierte Aufführung der Ergebnisse der *pipe*-Promotoranalyse

Der konservierte Sequenzabschnitt von -1135 bis -985 bp, welcher wahrscheinlich alle notwendigen regulatorischen Elemente für die korrekte *pipe*-Expression beherbergt, wurde mit verschiedenen Programmen auf die Präsenz bekannter TFBS untersucht. In Tabelle A 1 sind alle möglichen TFBS, die von den Programmen Promo, STAMP und Motif Search (Cut off Score 70) angezeigt wurden, aufgelistet. Zudem wurde die Expression der potentiell zugehörigen Transkriptionsfaktoren in Ovarien und dem Follikel epithel durch Abgleich mit den auf FlyBase zu Verfügung stehenden modENCODE-Daten angegeben (Graveley, Brooks et al. 2011). Außerdem ist eine mögliche EGFR-abhängige Regulation aufgeführt.

Tabelle A 1: Ergebnisse der TFBS-Datenbanken-Abfragen (zusätzlich sind die modENCODE-Expressionsdaten und die potentielle EGF-abhängige Regulation der TFs angegeben)

Transkriptionsfaktor	Promo	Motif Search Score 85 Score 70	STAMP	Expression in Ovarien/ Follikelzellen (modENCODE)	EGF-reguliert
Hb	X	X	X	high/no	MAPK target
Dfd	X			extremely low	
Ftz	X			extremely low	
Dorsal	X	X	X	moderate	
GCM	X	X		very low	
Mad	X			very high	
Eve	X		X	extremely low	
Zen-1	X		X	very low	
tll	X		X	very low	
E74A/Elf-1	X	X		very low	
croc		X	X	no	
BR-C		X	X	low	
Ttk		X		moderate	
Dref			X	moderate	
Aef1			X	very low	
TFAM/HMG/cic			X	moderate	Cic down-reg. by Ras
bin			X	extremely low	
DTF-1	X			?	
DSXF	X			very low	
DSXM	X			very low	
Prd	X			very low	
Kr		X		very low	
Ubx		X		very low	

STAT		X		very high	
Hairy		X		moderate	
Zeste		X		moderate	
Bcd		X		very high	substrate of MAPK
Snail		X	X	no	
Abd-B		X	X	no	
CF1/usb		X		moderate	
Cf-2		X		moderately high/yes	
sd			X	moderate	
BEAF-32			X	very high	
slbo			X	extremely low	
Gsb-n/gsb			X	very low	
dl-A			X	moderate	
brk			X	yes	
pho			X	no	
Hsf			X	high	
SuH			X	moderate	

Die Absenkung des Cut off Scores im Programm Motif Search führte zwar zu einer Erhöhung der Zahl der TFBS-Vorhersagen, im Gegenzug sinkt aber die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Vorhersage.

Vergleich der Expressionstärke der Treiberlinien *Cy2-* und *Traffic jam-Gal4*

Die uniforme Expression von *pipe* im Follikelepithel erfolgt mit zwei unterschiedlichen Gal4-Treiberlinien. Um den Einfluss unterschiedlicher *pipe*-Konzentrationen auf die dorsoventrale Achsenbildung zu untersuchen, wurde die schwache *Cy2-Gal4* sowie die starke *Traffic jam-Gal4* Linie bei verschiedenen Temperaturen verwendet. Zur Abschätzung wie sehr sich die Expressionslevels unterscheiden, wurde neben dem Nachweis der *pipe*-mRNA im Follikelepithel (vgl. Abb. 3. 22) stellvertretend die UAS-GFP-Expression mittels Western Blot und einer densitometrischen Analyse abgeschätzt.

Hier zeigte sich, dass die Verwendung der *Traffic jam-Gal4*-Linie im Vergleich zur *Cy2-Gal4*-Treiberlinie zu einer 2-3 fachen Erhöhung der Proteinexpression im Follikelepithel führt (vgl. Abbildung A 7). Die Abschätzung der relativen Proteinexpression bei verschiedenen Temperaturen ist nicht möglich, da die Entwicklung der Individuen unterschiedlich schnell verläuft. Die fehlende Synchronisation der Oogenese bei unterschiedlichen Temperaturen

verhindert einen Vergleich der Proteinlevels, da nicht garantiert werden kann, dass in allen Fällen die Analyse in ähnliche Entwicklungsstadien stattfindet.

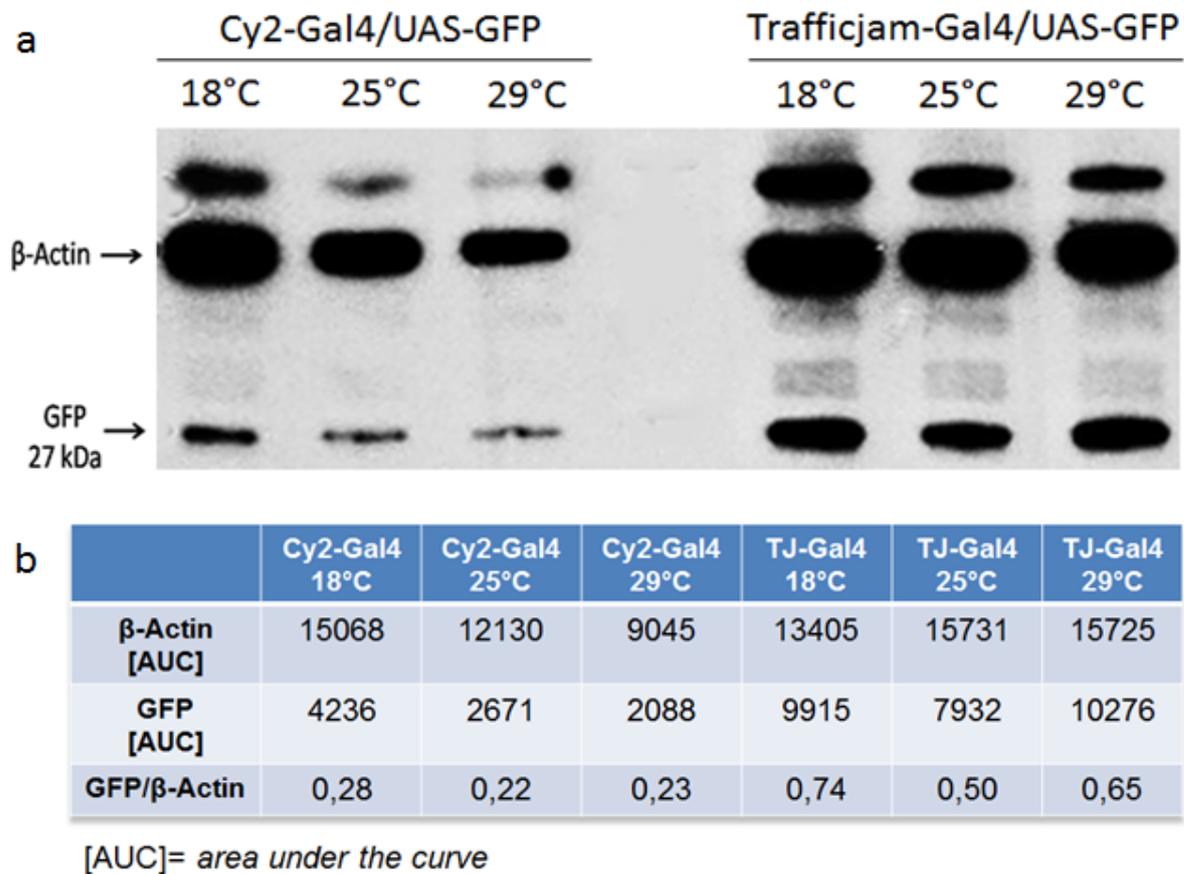


Abbildung A 7: Western Blot und densitometrische Abschätzung der GFP-Expression in Ovarien zum Vergleich der Expressionsstärke verschiedener Gal4-Treiberlinien bei unterschiedlichen Temperaturen (a) Proteinextrakte aus homogenisierten Ovarien von Fliegen, in deren Follikel­epithel UAS-GFP mit Hilfe der Treiberlinien *Cy2-Gal4* oder *Traffic jam-Gal4* bei verschiedenen Temperaturen überexprimiert wurde, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. GFP (27 kDa) wurde mit einem monoklonalen Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet. (b) Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Western Blot-Banden mit dem Programm ImageJ und relative Quantifizierung der GFP-Proteinexpression.

Zusammenfassung

Die Polarität der dorsoventralen (DV-) Achse in *Drosophila melanogaster* wird schon während der Oogenese festgelegt. Im Bereich des am anterioren Kortex lokalisierten Oozytenkerns wird der EGFR-Ligand Gurken in den Perivitellinspalt (PVS) sezerniert und aktiviert den EGF-Signalweg in umliegenden Follikelzellen. In diesen, nun als dorsal determinierten, Zellen wird ein Transkriptionsfaktor (TF) aktiviert, der die Expression von *pipe* auf den ventralen Bereich der Eikammer beschränkt. Die dorsale Repression wird von dem Repressorelement *Motiv B* vermittelt, das innerhalb des 1,5 kb langen essentiellen *pipe*-Promotors liegt. Unter Kontrolle dieses Promotors wurde ein EGFP-Pipe-Fusionsprotein exprimiert, mit dem die Präsenz des Pipe-Proteins in ventralen Follikelzellen und dessen subzelluläre Lokalisation im Golgi-Kompartiment visualisiert werden konnte. Außerdem konnte mit diesem Konstrukt gezeigt werden, dass die Deletion des *Motiv B* oder weiterer Promotorsequenzen (*Motiv 69*) nicht zur vollständigen Derepression von *pipe* führt. Durch Reporteranalysen in *Drosophila* Schneider 2-Zellkulturen und *in vivo* wurde auch verifiziert, dass *Motiv B* oder dessen Erweiterung *Motiv 69* allein nicht ausreichen die dorsale *pipe*-Repression zu vermitteln. Im *pipe*-Promotor konnten noch weitere stark konservierte Sequenzen, die möglicherweise als zusätzliche Repressorelemente dienen, identifiziert werden. Deren Funktion wurde aber noch nicht untersucht. Stattdessen wurde geprüft, ob die unvollständige Derepression von *pipe* durch post-transkriptionelle Regulation bedingt wird. Zwar führte die Deletion potentieller Bindestellen für microRNAs zu einer Erhöhung der EGFP-Pipe-Expression, dessen räumliche Verteilung in Eikammern wurde dadurch aber nicht verändert. Mittels DNA-Affinitätschromatographie, Promotoranalysen sowie RNAi-Experimenten wurde versucht den Transkriptionsfaktor zu finden, der die identifizierten Repressorelemente bindet. Ein ETS-verwandtes Gen wurde als potentieller Regulator des *pipe*-Repressors ausgemacht, der Repressor selbst konnte aber nicht identifiziert werden. Inzwischen ist Mirror von zwei Arbeitsgruppen parallel als EGF-abhängiger transkriptioneller Repressor von *pipe* bestätigt worden.

Die auf die ventralen 40% der Follikelzellen begrenzte Expression von *pipe* führt zur asymmetrischen Modifikation von Komponenten der Eihülle wie dem Vitelline membrane-like (VML) Protein. Hierdurch wird die proteolytische Aktivierung des Toll-Liganden Spätzle ventral initiiert. Die lokale Produktion und Diffusion von aktiviertem Spätzle etabliert den intranukleären Dorsal-Gradienten im Embryo. Durch die Analyse ektopischer VML-RFP markierter *pipe*-exprimierender Klone wurde bestätigt, dass der Dorsal-Gradienten von der Diffusion eines Faktors im PVS abhängt und durch laterale Inhibition etabliert und stabilisiert wird. Die Beobachtung, dass trotz uniformer *pipe*-Expression DV-Polarität zu beobachten ist,

deutet darauf hin, dass neben der notwendigen enzymatischen Funktion von *pipe* ein weiterer Faktor an der Initiierung des ventralen Achsen-Pols beteiligt ist.

Abstract

Polarity of the dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster* is already determined during oogenesis. Grk protein is secreted into the perivitelline space in a region nearby the oocyte nucleus which is positioned at the anterior-dorsal cortex of the oocyte. Activated EGF-signaling in adjacent follicle cells induces them to adopt a dorsal fate. They express an EGF-dependent transcription factor which represses *pipe* and thus restricts *pipe* transcription to the ventral part of the egg chamber. Repression of *pipe* is mediated by a repressor element called *Motif B*, which is found in the 1.5 kb region essential for *pipe* expression. Using this promoter, an EGFP-Pipe fusion protein was expressed to visualize the presence of Pipe protein in ventral follicle cells and the Golgi compartment. Furthermore, this construct was used to show that neither the deletion of *Motif B* nor of *Motif 69* resulted in complete derepression of *pipe*. Reporter gene assays in *Drosophila* Schneider 2 cell culture and *in vivo* analysis revealed that neither *Motif B* nor its extended version *Motif 69* alone are sufficient to mediate dorsal *pipe* repression. In agreement with these findings, highly conserved sequences were identified outside the region harboring *Motif B* and *Motif 69*, which could serve as additional repressor elements. Their function has not been analyzed. However, we investigated whether the incomplete derepression of *pipe* is due to post-transcriptional regulation. Although the deletion of potential binding sites for microRNAs led to increased EGFP-Pipe expression, the spatial distribution was not altered in egg chambers. DNA affinity chromatography, promoter analysis, and RNAi experiments were performed to isolate a transcription factor (TF), which binds the *cis*-regulatory element. While no candidate TFs were found using bioinformatics or biochemistry, *in vivo* studies showed that one of the ETS-related genes might act as a potential regulator of a *pipe* repressor. Recently, two labs independently identified Mirror as an EGF-dependent transcriptional repressor of *pipe*.

Finally, asymmetric expression of *pipe* in the ventral-most 40% of follicle cells leads to an enzymatic modification of eggshell components, including Vitelline membrane-like (VML) protein. This defines the region where the Toll ligand Spätzle is proteolytically activated. Subsequent diffusion of activated Spätzle establishes the embryonic Dorsal gradient. Analysis of ectopic *pipe* clones marked with VML-RFP show that establishment and stabilization of the gradient depends on lateral inhibition and on diffusion of a factor which derives from the perivitelline space. Due to the fact that even uniform *pipe* expression allows the establishment of DV polarity, it is very likely that, in addition to Pipe's enzymatic function, yet another factor is involved in the initiation of dorsoventral polarity.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. Roth, Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln, danke ich für die Überlassung des Themas, die interessanten Anregungen und Gespräche zu verschiedenen Experimenten sowie zahlreiche Ratschläge während meiner Doktorarbeit.

Herr Prof. Dr. G. Plickert, Institut für Zoologie der Universität zu Köln, danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herr Prof. Dr. M. Hülkamp, Institut für Botanik der Universität zu Köln danke ich für die Übernahme des Vorsitzes und Frau Dr. Julia Hatzold für die Übernahme des Beisitzes bei der Disputation.

Allen jetzigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppen Roth danke ich für die zu jeder Zeit sehr harmonische Atmosphäre während und abseits des Laboralltags.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit immer bedingungslos unterstützt haben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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, 09.10.2012

Meike Knispel

Teilpublikationen:

Technau M, Knispel M, Roth S. (2011) Molecular mechanisms of EGF signaling-dependent regulation of *pipe*, a gene crucial for dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Dev Genes Evol.* 222(1):1-17

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Meike Knispel
Anschrift	Deutzer Freiheit 65 50679 Köln
Geburtsdatum und –ort	29.11.1983 in Münster
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

1990 - 1994	St. Andreas Grundschule in Korschenbroich
1994 - 2003	Don Bosco-Gymnasium in Korschenbroich

Studium

10/2003 – 05/2008	Biologie-Studium an der Universität zu Köln Diplom-Prüfungsfächer: Genetik, Entwicklungsbiologie, Pharmakologie Diplomarbeit bei Dr. Dirk Taubert am Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln Titel: Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion: Interaktionen mit organischen Kationentransportern und Einfluss auf Zytokinexpression, mitochondriale Toxizität und Apoptose
seit 07/2008	Doktorarbeit bei Prof Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln Titel: Transkriptionelle Regulation von <i>pipe</i> und dessen Einfluss auf die dorsoventrale Musterbildung in <i>Drosophila melanogaster</i>

Publikationen:

Jung N, Lehmann C, Rubbert A, Knispel M, Hartmann P, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Faetkenheuer G, Taubert D. (2008) Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drug Metab Dispos.* 36(8):1616-23

Technau M, Knispel M, Roth S. (2011) Molecular mechanisms of EGF signaling-dependent regulation of *pipe*, a gene crucial for dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Dev Genes Evol.* 222(1):1-17

Jung N, Lehmann C, Knispel M, Meuer E, Fischer J, Fätkenheuer G, Hartmann P, Taubert D. (2012) Long-term beneficial effect of protease inhibitors on the intrinsic apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients. *HIV Med.*

