

**Entwicklungsgenetische Analyse der
Differenzierungsprozesse im viszeralem
Mesoderm von *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften

(Doctor rerum naturalium, Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08 - Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Georg Josef Franz Wolfstetter

geboren in Rosenheim

Dornholzhausen-Langgöns, 2012

Diese Arbeit wurde gemäß den Vorschriften der Promotionsordnung der Gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften für die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 4. Februar 2005 am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie; Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie des Fachbereichs 08 der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Adriaan W. C. Dorresteijn durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Promotionsausschussvorsitzender: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

Erster Gutachter: Prof. Dr. Adriaan W.C. Dorresteijn

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Tina E. Trenczek

Eingereicht am:

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Georg Wolfstetter and Anne Holz (2012). The role of *LamininB2* during mesoderm differentiation in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69(2)**, 267-282.

Georg Wolfstetter*, **Margret Shirinian***, **Christiana Stute**, **Caroline Grabbe**, **Thomas Hummel**, **Stefan Baumgartner**, **Ruth H. Palmer and Anne Holz** (2009). Fusion of circular and longitudinal visceral muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm. *Mechanisms of Development* **126**, 721-736. *Joint first authors.

Themenbezogene Tagungsbeiträge, sofern diese im Rahmen eines Sonderdrucks veröffentlicht wurden:

Georg Wolfstetter, Christiana Stute and Anne Holz (2008). Analysis of mutations that affect visceral muscle cell morphology and display restricted outgrowth of visceral myotubes in *Drosophila*. *European Journal of Cell Biology* **87S1 (Suppl. 58)**, MS9-2.

Verwendete Abkürzungen:

Ac = Acetat

DNA = Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

cDNA = Complementary desoxiribonucleic acid

mRNA = Messenger ribonucleic acid

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

Einbuchstabencode der Aminosäuren:

A = Alanin

C = Cystein

D = Aspartat

E = Glutaminsäure

F = Phenylalanin

G = Glycin

H = Histidin

I = Isoleucin

K = Lysin

L = Leucin

M = Methionin

N = Asparagin

P = Prolin

Q = Glutamin

R = Arginin

S = Serin

T = Threonin

V = Valin

W = Tryptophan

Y = Tyrosin

Einbuchstabencode der Nukleinbasen:

A = Adenin

T = Thymin

G = Guanin

C = Cytosin

U = Uracil

N = beliebige Nukleinbase

EMS = Ethylmethansulfonat

GFP = Grün fluoreszierendes Protein

IgG = Immunglobulin G

M = Molar

MOPS = 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure

PIPES = Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)

RT = Raumtemperatur

SDS = Natrium dodecylsulfate

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UAS = Upstream activating sequences

UpM = Umdrehungen pro Minute

UTR = Untranslated region

VT = Volumenteil

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Summary	2
2. Einleitung	3
2.1. Aufbau und Entwicklung des Mitteldarms von <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.2. Die Abhängigkeit der Mitteldarmentwicklung von Interaktionen zwischen Entoderm und viszeraler Muskulatur	7
2.3. Die extrazelluläre Matrix von <i>Drosophila melanogaster</i>	8
2.4. Vorgegangene Arbeiten und Aufgabenstellung	11
3. Material	12
3.1. Verbrauchsmaterialien	12
3.2. Chemikalien	12
3.3. Geräte	12
3.4. Lösungen und Puffer	13
3.5. Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> K12 (<i>E. coli</i>)	14
3.5.1. Antibiotikazusätze	14
3.6. Medien zur Stammhaltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	15
3.7. Enzyme und Puffer	15
3.8. Standards und Reagenziensätze	15
3.9. Antikörper und Seren	16
3.9.1. Verwendete Primärantikörper	16
3.9.2. Verwendete Sekundärantikörper	17
3.9.3. Verwendete Seren	17
3.10. Einbettungsmedien und Immersionsöl für die Mikroskopie	17
3.11. Verwendete DNA-Vektoren	18
3.12. Verwendete cDNA-Klone	22
3.13. Synthetische Oligonukleotide (Primer)	22
3.14. Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i> K12)	24
3.15. Fliegenstämme (<i>Drosophila melanogaster</i>)	24
3.16. Verwendete Software	24
4. Methoden	25
4.1. Agarosegelelektrophorese	25

4.2.	DNA-Präparation aus wässrigen Lösungen	25
4.2.1.	Natriumacetat-Ethanol-fällung	25
4.2.2.	Isopropanol-fällung	26
4.2.3.	Aufreinigung mit dem Illustra-GFX-Reagentiensatz	26
4.3.	DNA-Isolation aus Agarosegelen	26
4.4.	Präparation genomischer DNA aus Fliegen	26
4.5.	Photometrische Analyse von gereinigten Nukleinsäuren	27
4.6.	Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren	27
4.6.1.	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
4.6.2.	Dephosphorylierung von freien 5'-Enden	27
4.6.3.	Ligation von DNA-Fragmenten	28
4.6.4.	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem TOPO TA-Dual-Promoter-System	28
4.6.5.	Klonierung eines <i>UAS-LamininB2 (UAS-LanB2)</i> -Transformationsvektors	28
4.7.	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	29
4.8.	Markierung von RNA-Sonden mittels <i>in vitro</i> Transkription	30
4.8.1.	Herstellung von <i>LamininB2</i> -Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	31
4.9.	Überprüfung der Markierungseffizienz (Spot-Test)	32
4.10.	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> K12	33
4.10.1.	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	33
4.10.2.	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	34
4.10.3.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im analytischen Maßstab (Miniprep)	34
4.10.4.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab (Midiprep)	35
4.11.	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	35
4.11.1.	Zucht und Stammhaltung	35
4.11.2.	Kreuzungsexperimente zur Analyse genetischer Interaktionen	35
4.11.3.	Kreuzungsexperimente mit dem Gal4-UAS-System	36
4.11.4.	Gal4-UAS induzierte RNA-Interferenz (RNAi)	37
4.11.5.	Präparation einzelner Embryonen für die PCR-Analyse	37
4.11.6.	Fixierung von Embryonen	38
4.11.7.	Phalloidin-färbung an fixierten Embryonen	38
4.11.8.	<i>whole mount</i> -Fluoreszenz-Antikörperfärbung an fixierten Embryonen	39
4.11.9.	<i>whole mount-in situ</i> -Hybridisierung an fixierten Embryonen	39
4.11.10.	Signalverstärkung mit der ABC-Methode (Avidin-Biotin Complex Method)	40
4.11.11.	Histochemischer Nachweis der Peroxidaseaktivität	42
4.11.12.	Fluoreszenzmarkierung mit dem TSA-Reagentiensatz	42
4.12.	DNA-Sequenzierung	43
4.13.	P-Element basierte Keimbahntransformation	43

4.14. Synthese von Oligonukleotiden	43
5. Ergebnisse	44
5.1. Isolierung der Allele <i>gürtelchen</i> (<i>gurt</i>) und <i>knödel</i> (<i>knod</i>) aus 3B1-038	44
5.2. Charakterisierung von <i>gürtelchen</i> (<i>gurt</i>)	45
5.2.1. Analyse der Determination von viszeralen Muskelzelltypen in <i>gurt</i> -Embryonen	46
5.2.2. Analyse der Entodermentwicklung in <i>gurt</i> -Mutanten	48
5.2.3. <i>gurt</i> ist ein neues Allel des <i>huckebein</i> (<i>hkb</i>)-Gens (CG9768)	51
5.2.4. Morphologische Analyse der viszeralen Muskulatur in Mutanten von terminalen Selektorgenen	53
5.2.5. Vergleichende Analyse der viszeralen Muskelentwicklung in <i>hkb</i> -Embryonen und <i>mbc^{C1}</i> -Fusionsmutanten	55
5.3. Charakterisierung von <i>knödel</i> (<i>knod</i>)	58
5.3.1. Zytologische Charakterisierung von <i>knödel</i> (<i>knod</i>) und <i>l(3)67BDb¹</i>	58
5.3.2. Nachweis von <i>LamininB2</i> -Transkripten	58
5.3.3. Proteinverteilung von <i>LamininB2</i>	59
5.3.4. Verteilung von sekretiertem <i>Laminin</i> in der extrazellulären Matrix	61
5.3.5. <i>knod</i> und <i>l(3)67BDb¹</i> sind Allele des <i>LamininB2</i> (<i>LanB2</i>)-Gens (CG3322)	62
5.3.6. <i>LanB2^{MB04039}</i> ist ein larval-letales <i>LamininB2</i> -Allel	64
5.3.7. Morphologische Analyse von <i>LanB2</i> -Nullmutanten	66
5.3.8. Überexpression von <i>LanB2</i> in wildtypischen- und <i>LanB2</i> -mutanten Embryonen	70
5.3.9. RNAi-induzierter „knock-down“ der <i>LamininB2</i> -Genexpression	72
5.3.10. Aufbau der extrazellulären Matrix und der Basallamina in <i>LanB2</i> -Mutanten	74
5.3.11. Charakterisierung des Mitteldarmphänotyps von <i>LanB2</i> -Mutanten	77
5.3.12. Vergleichende Analyse der Mitteldarmmorphologie von unterschiedlichen <i>Laminin</i> mutanten	86
5.3.13. Genetische Interaktionen von <i>LanB2</i> mit <i>Thrombospondin</i> und <i>kon-tiki</i> in der somatischen Muskulatur	89
6. Diskussion	92
7. Internetressourcen	108
8. Literaturverzeichnis	109
9. Versicherung	120
10. Danksagung	121
Appendix	A-G

1.1. Zusammenfassung

Der larvale Mitteldarm der Taufliege *Drosophila melanogaster* wird während der Embryonalentwicklung gebildet und besteht aus dem entodermalen Darmepithel, der viszeralen Muskulatur sowie der dazwischen liegenden extrazellulären Matrix (ECM). Bisherige Studien zur Mitteldarmentwicklung konzentrierten sich vor allem auf die Rolle der viszeralen Muskulatur, mögliche Einflüsse des Entoderms und der ECM wurden dagegen kaum untersucht.

Mit Hilfe des Allels *3B1-038*, das aufgrund eines charakteristischen viszeralen Phänotyps identifiziert wurde (Stute et al., 2004), konnten diese Aspekte nun erstmals analysiert werden. Die Komplementationsanalyse von *3B1-038* offenbart zwei unabhängige Mutationen auf dem betroffenen Chromosom, die sich beide auf die viszerale Muskeldifferenzierung auswirken. In Anlehnung an die charakteristischen viszeralen Phänotypen wurden die entsprechenden Allele „gürtelchen“ (*gurt*) und „knödel“ (*knod*) genannt.

Die morphologische Analyse von *gurt* enthüllt weder Defekte während der Frühentwicklung des viszeralen Mesoderms noch während der Myoblastenfusion. Allerdings unterbleibt die Streckung der viszeralen Myotuben während der späteren Myogenese. Weitere Analysen decken den Verlust der Mitteldarmzellen in mutanten Embryonen auf, was schließlich zur Identifikation von *gurt* als Allel der entodermalen Determinante *huckebein* (*hkb*) führt. Interessanterweise werden charakteristische Streckungsdefekte in der viszeralen Muskulatur auch durch Mutationen in anderen entodermalen Selektorgenen hervorgerufen, was einen bislang unbekanntem Einfluss des Entoderms auf die viszerale Muskeldifferenzierung aufdeckt.

Durch die Identifizierung des viszeralen Allels *knödel* als neues Null-Allel des *LamininB2* (*LanB2*)-Gens, konnte darüber hinaus der Einfluss der ECM auf die Mitteldarmentwicklung untersucht werden. Der Verlust von *LanB2* beeinträchtigt die extrazelluläre Verteilung von anderen ECM-Komponenten und verhindert die Bildung einer Basallamina (BM). In mutanten Embryonen kommt es außerdem zur Fehlentwicklung des Mitteldarms, des Herzens, des Nervensystems, der Tracheen, der Körpermuskulatur und des Fettkörpers. Im Zuge der Mitteldarmentwicklung beeinflusst Laminin die gerichtete Migration von Entoderm und longitudinalen Muskelgründerzellen. In späteren Stadien kommt es zum Verlust der epithelialen Polarität in den Entodermzellen, zu Streckungsdefekten in den viszeralen Myotuben und zur abnormalen Entwicklung der Magenblindsäcke und der Cardia. Das *Drosophila*-Genom kodiert für vier Lamininuntereinheiten, die sich zu zwei unterschiedlichen Heterotrimeren zusammenlagern. Die hier durchgeführten Experimente legen nahe, dass beide Trimere während der Mitteldarmentwicklung wirken und unterschiedliche Rollen während des Zusammenbaus der Basallamina und der Gewebeadhäsion übernehmen. Weitere Analysen decken eine genetische Interaktion zwischen *LanB2* und dem *NG2/CSPG4*-verwandten *kon-tiki* (*kon*) sowie

Thrombospondin (*TSP*) in der somatischen Muskulatur auf, was auf eine Funktion von Laminin während der Muskelanheftung und dem Erhalt der Muskulatur hindeutet.

1.2. Summary

The larval midgut of the fruit fly *Drosophila melanogaster* is established during embryogenesis and consists of an inner endodermal epithelium and the visceral musculature, both embedded in the extracellular matrix (ECM). Previous studies provided detailed insights into the “mesodermal aspects” of midgut development while possible influences from the endoderm and the ECM have been barely investigated.

To address this point I analysed the allele *3B1-038* which had been identified due to a characteristic visceral phenotype (Stute et al., 2004). Deficiency mapping uncovers two independent mutations on the affected chromosome, that both impair visceral muscle differentiation. According to their distinct visceral phenotypes, the corresponding alleles were named “gürtelchen” (*gurt*) and “knödel” (*knod*).

Further analysis of *gurt* mutant embryos reveals that early visceral mesoderm development and myoblast fusion appear unaffected. However, at the end of embryogenesis visceral myotube elongation is completely blocked and two belt-shaped muscle strands flank the central yolk. Examination of the endoderm development uncovers the complete loss of midgut cells in mutant embryos. *gurt* is finally identified as novel allele of the terminal gap gene *huckebein* (*hkb*) which is pivotal for endoderm determination. Interestingly, visceral muscle differentiation is also impaired in the absence of other endodermal selector genes. These results enlighten a previously unconsidered aspect of visceral muscle development.

Investigating a role of the ECM during midgut development I took advantage of the *knödel* (*knod*) allele that turned out to be a novel null mutation in the *LamininB2* (*LanB2*) gene. The loss of *LamininB2* affects extracellular deposition of other ECM-components and induces the breakdown of basement membranes (BM). As further consequence, *LanB2* mutant embryos exhibit phenotypes in a wide range of tissues including midgut, heart, trachea, nervous system, fat body and somatic musculature. The visceral phenotype is characterized by defects during endoderm migration, midgut epithelium formation, guided migration and stretching of visceral myotubes as well as an abnormal morphology of gastric caeca and cardia. The *Drosophila* genome encodes for four laminin subunits that self-assemble into two distinct heterotrimers. Comparative analyses reveal a redundant function of both trimers during midgut development but also their individual roles during BM self-assembly and tissue adhesion. Finally, *LanB2* interacts genetically with the *NG2/CSPG4*-homolog *kon-tiki* and *Thrombospondin* in the somatic musculature, indicating an influence of laminin on muscle attachment and maintenance of muscle tendon sites.

2. Einleitung

Unser Verständnis von der genetischen Regulation der Entwicklungsprozesse in vielzelligen Organismen hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Einer der Gründe hierfür liegt in der Etablierung von Mutagenesestrategien an morphologisch umfassend charakterisierten und genetisch leicht zugänglichen Organismen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Die Durchmusterung von Mutantenkollektionen zur systematischen Identifikation entwicklungsrelevanter Gene anhand einfacher, phänotypischer Merkmale ist dabei sicher als Meilenstein in der modernen Entwicklungsbiologie zu betrachten.

Von Hummel et al., (1999a, b) wurde eine Kollektion mit embryonal-letalen Mutationen des zweiten und dritten Chromosoms von *Drosophila melanogaster* etabliert. Im Laufe der letzten Jahre wurde diese Kollektion im Hinblick auf verschiedene entwicklungs-genetische Aspekte durchmustert. Dadurch konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die eine essentielle Funktion während der neuronalen Entwicklung, der somatischen und viszeralen Myogenese sowie der Herzentwicklung haben (Hummel et al., 1999a, b; Önel et al., 2004; Schröter et al., 2004; Stute et al., 2004; Albrecht et al., 2006; Schäfer et al., 2007).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der morphologischen und genetischen Charakterisierung von Mutationen, die während einer Durchmusterung dieser Kollektion nach viszeralen Muskeldefekten identifiziert wurden (Stute et al., 2004). Deshalb soll zunächst die Entwicklung des larvalen Mitteldarms beschrieben werden.

2.1. Aufbau und Entwicklung des Mitteldarms von *Drosophila melanogaster*

Der larvale Darmtrakt von *Drosophila* wird während der Embryogenese gebildet und lässt sich vereinfacht in Vorder-, Mittel- und Enddarm untergliedern. Jeder dieser Abschnitte besteht dabei aus einem innerem Darmepithel, welches das Darmlumen umschließt sowie einer äußeren Schicht aus spezialisierten, quergestreiften Muskeln (der so genannten viszeralen Muskulatur), welche für die Darmperistaltik verantwortlich ist (Abb. 2.1). Im Unterschied zu Vorder- und Enddarm, deren Epithelien aus ektodermalen Anlagen hervorgehen, wird das Mitteldarmepithel von Zellen entodermaler Herkunft gebildet. Eine weitere Besonderheit stellt die Muskulatur des Mitteldarms dar, die sich aus einer inneren Schicht von zweikernigen zirkulären Myotuben und einer äußeren Schicht aus vielkernigen longitudinalen Muskeln zusammensetzt (Poulson, 1950; Goldstein und Burdette, 1971; Bate, 1993; Hartenstein, 1993; Klapper et al., 2001; Klapper et al., 2002). Folglich werden für die Entwicklung des Mitteldarms von *Drosophila* drei unterschiedliche Gewebe, i.e. das Entoderm, die zirkuläre viszera-

le Muskulatur und die longitudinale viszerale Muskulatur benötigt, die aus unterschiedlichen Anlagen im Embryo hervorgehen.

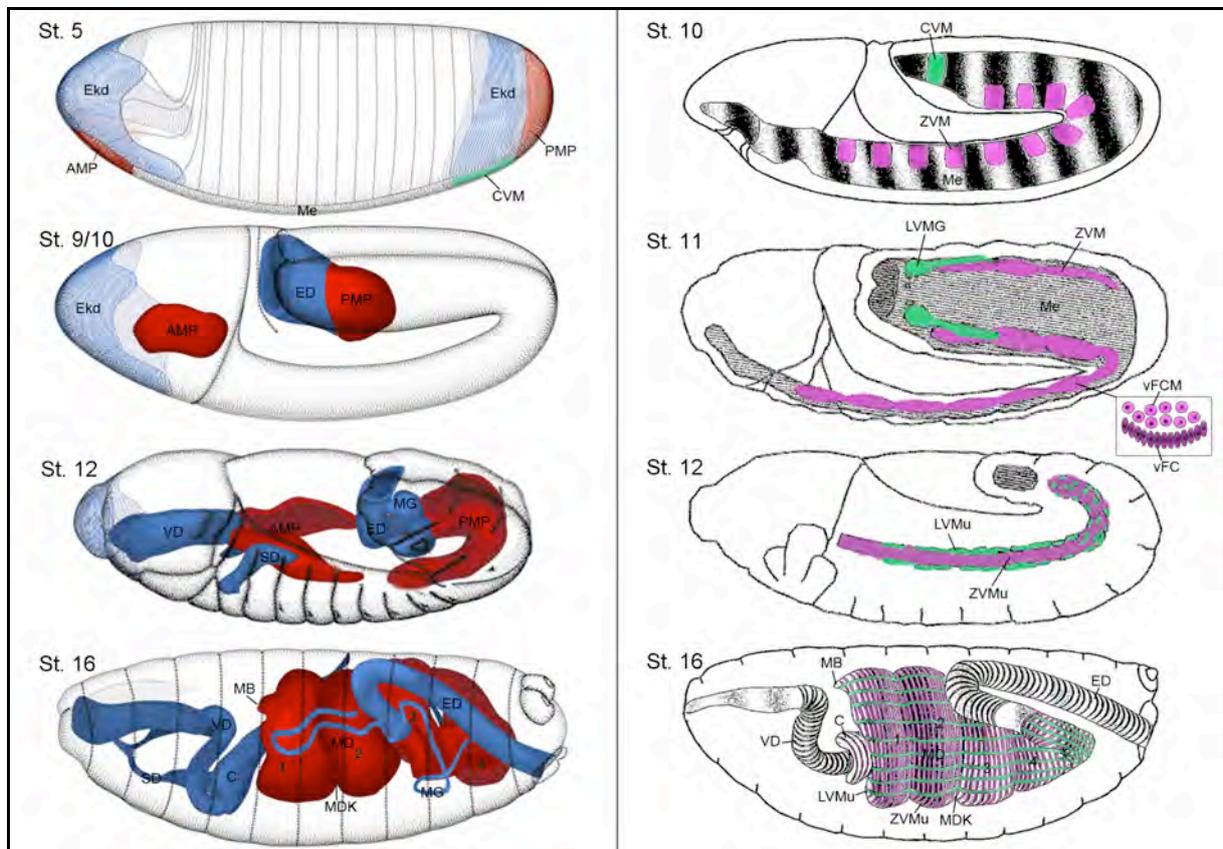


Abbildung 2.1: Entwicklung des larvalen Darmtrakts von *Drosophila melanogaster*. Schematische Darstellung von *Drosophila*-Embryonen (anterior ist links, dorsal oben). Die Entwicklung des Entoderms ist auf der linken Seite, die Entwicklung der zirkulären und longitudinalen viszeralen Muskulatur auf der rechten Seite dargestellt. Die einzelnen Aspekte der jeweiligen Gewebsdifferenzierung werden teilweise anhand unterschiedlicher Entwicklungsstadien (links St. 5-16, rechts St. 10-16) verdeutlicht. Die Einzelbilder zur Ento- und Ekto-dermentwicklung wurden von Hartenstein (1993) und die Einzelbilder zur Entwicklung der viszeralen Muskulatur von Lee et al. (2006) in veränderter Form übernommen. AMP= Anteriore Mitteldarmprimordium, C= Cardia, CVM= Caudales Viszerale Mesoderm, ED= Enddarm, Ekd= Ektodermale Darmanlagen, LVMG= Longitudinale viszerale Gründerzellen, LVMu= Longitudinale viszerale Muskeln, MB= Magenblindsack, MD= Mitteldarm (Kammern von 1-4 nummeriert), MDK= Mitteldarmkonstriktion, Me= Mesoderm, MG= Malpighische Gefäße, PMP= Posteriore Mitteldarmprimordium, VD= Vorderdarm, SD= Speicheldrüse, ZVM=Zirkuläres viszerale Mesoderm, vFC= visceral Founder Cell, vFCM= visceral Fusion Competent Myoblast, ZVMu= Zirkuläre viszerale Muskeln.

Für die Entstehung des Mitteldarmepithels ist die Determination der entodermalen Anlagen notwendig, ein Prozess, dessen genetische Regulation in *Drosophila* gut untersucht ist. So kommt es unter dem Einfluss des Torso-Signalwegs zur Aktivierung der terminalen Lückengene *huckebein* (*hkb*) und *tailless* (*tll*) am anterioren und posterioren Pol des Embryos. Die Expressionsdomänen von *hkb* im Blastodermstadium reflektieren dabei die Positionen der prospektiven Mitteldarmanlagen (Furriols und Casanova, 2003; Pignoni et al., 1990; Brönnner und Jäckle, 1991). Huckebein ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl die mesodermale Diffe-

renzung unterdrückt als auch die Entwicklung der entodermalen Anlagen fördert (Reuter und Leptin, 1994; Weigel et al., 1990). In den Entodermanlagen aktiviert *hkb* die transiente Expression von *serpent* (*srp*), das seinerseits als Selektorgen fungiert, indem es die Ektodermentwicklung unterdrückt und das entodermale Zellschicksal aufrecht erhält (Reuter 1994; Rehorn et al., 1996). Ein weiterer Faktor, der für die gesamte Darmentwicklung essentiell ist, ist der Transkriptionsfaktor Forkhead (FKH) (Jürgens und Weigel, 1988; Weigel et al., 1989). *forkhead* wirkt als homeotisches Selektorgen und unterdrückt das segmentale Entwicklungsschicksal zu Gunsten der terminalen Differenzierung, weshalb in *fkh*-Mutanten die ektodermalen Darmanlagen zu ektopischen Kopfstrukturen transformiert sind. Der gleiche Faktor ist auch für den Erhalt der Entodermanlagen entscheidend, die in *fkh*-Mutanten degenerieren (Weigel et al., 1989).

Während der Gastrulation gelangen die Entodermanlagen durch Invagination ins Keimesinnere. Die Zellen des anterioren Mitteldarmprimordiums (AMP) verlieren dabei ihre ursprünglich epitheliale Organisation und bilden im Stadium 11 einen Cluster an der Spitze des Stomodaeums, der von den Bändern des viszerale Mesoderms flankiert wird. Die Zellen des posterioren Mitteldarmprimordiums (PMP) behalten zunächst ihre epitheliale Organisation bei und kommen im voll verlängerten Keimstreif zwischen den Bändern des zirkulären viszerale Mesoderms zu liegen, wobei sie gleichzeitig an die Anlage der longitudinalen Muskelgründerzellen angrenzen (Poulson, 1950; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Reuter et al., 1993; Tepass und Hartenstein, 1994).

Die viszerale Muskulatur des Mitteldarms setzt sich aus zirkulären und longitudinalen Myotuben zusammen deren Anlagen aus unterschiedlichen Bereichen des Mesoderms hervorgehen. Die Anlagen der zirkulären viszerale Muskulatur werden erst am Ende der Gastrulation in definierten Bereichen des dorsalen Rumpfmesoderms spezifiziert (Abb. 2.1; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Im Stadium 10 besteht das prospektive viszerale Mesoderm zunächst aus 11 segmental angeordneten Zellclustern entlang des inneren Keimstreifs, welche durch die kombinierte Expression der Transkriptionsfaktoren *bagpipe* und *biniou* gekennzeichnet sind (Azpiazu und Frasch, 1993; Zaffran et al., 2001). Innerhalb dieser Cluster bilden sich kurz darauf unter dem Einfluss des Jelly Belly/Anaplastische Lymphom Kinase (JEB/ALK)-Signalwegs zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Myoblastensubtypen aus. Säulenförmige Muskelgründerzellen (Founder cells, FCs) entstehen an den äußeren, ventralen Rändern jedes Clusters und umranden die globulären fusionskompetenten Myoblasten (Fusion competent myoblasts, FCMs). Die Information zur Bildung und Differenzierung einer viszerale Muskulatur ist dabei inhärent in den FCs verankert, während die

FCMs als untergeordnete Fusionspartner für die zirkulären und longitudinalen FCs betrachtet werden. Im Stadium 10/11 ordnen sich die viszerale Mesodermcluster zu einem durchgängigen Band entlang der anterior-posterioren Achse an und liegen als splanchnisches Mesoderm neben dem zentralen Dotter (Azpiazu und Frasch, 1993; Weiss et al., 2001; Klapper et al., 2002; Englund et al., 2003; Lee et al., 2003; Loren et al., 2003; Stute et al., 2004).

Die Gründerzellen der longitudinalen viszerale Muskeln gehen aus einem separaten Primordium an der posteriorsten Spitze des Mesoderms, dem sogenannten „caudalen viszerale Mesoderm“ (CVM) hervor (Abb. 2.1; Kusch und Reuter, 1999; San Martin et al., 2001; Ismat et al., 2010). Das CVM wird bereits vor der Gastrulation durch den kombinatorischen Einfluss mesodermaler Determinanten und Faktoren des terminalen Systems spezifiziert (Ismat et al., 2010). So induzieren die Transkriptionsfaktoren *brachyenteron* (*byn*) und *fkh*, die im Blastodermstadium terminal von *tll* aktiviert werden, zusammen mit der mesodermalen Determinante *snail* (*sna*) die Expression von *HLH54F* im Bereich des prospektiven CVM. Nach neuesten Erkenntnissen nimmt *HLH54F*, das für einen Transkriptionsfaktor vom basic-helix-loop-helix Typ kodiert, eine Schlüsselrolle während der Spezifizierung und dem Erhalt des CVM ein und ermöglicht dessen *twist*-unabhängige Entwicklung (Georgias et al., 1997; Ismat et al., 2010). Während der Gastrulation kommt es im Zuge der proktodealen Invagination auch zur Verlagerung des CVM ins Keimesinnere, wo es ventral des posterioren Mitteldarmprimordiums zu liegen kommt.

Die charakteristische Anordnung der viszerale Anlagen im Stadium 11 bildet die Ausgangssituation für die weitere Entwicklung des Mitteldarms (Abb. 2.1). So kontaktieren zunächst einzelne longitudinale Muskelgründerzellen die Bänder der zirkulären Muskulatur und migrieren auf diesen in anteriorer Richtung (Georgias et al., 1997; Klapper, 2000). Etwa zur gleichen Zeit haben die Zellen des PMP eine epithelial-mesenchymale Transition vollzogen und beginnen nach anterior zu wandern während die Zellen des AMP nach posterior migrieren. Die zwei Mitteldarmprimordien spalten sich während ihrer Wanderung in zwei Äste auf, die sich beidseitig zwischen dem zentralen Dottersacks und den Bändern des viszerale Mesoderms ausbreiten. Dabei bilden die Entodermzellen Fortsätze in Richtung des viszerale Mesoderms aus, das sie während ihrer Wanderung als Substrat nutzen (Poulson, 1950; Reuter et al., 1993; Tepass und Hartenstein, 1994). Während des Keimstreifrückzugs kommt es in den Bändern des zirkulären viszerale Mesoderms zur Fusion zwischen FCs und FCMs und es entstehen zunächst zweikernige Myotuben, welche später die innere Schicht der viszerale Muskulatur bilden werden (San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002). Etwa zur gleichen Zeit fusionieren auch die longitudinalen Muskelgründerzellen mit den verbliebenen FCMs

und adaptieren eine abgeflachte, längliche Morphologie auf den äußeren Rändern der viszeralen Bänder (Georgias et al., 1997; Klapper, 2000). Nach dem Zusammenschluss von AMP und PMP in der Mitte des Embryos breiten sich die Mitteldarmzellen nach dorsal und ventral aus und bilden allmählich ein einschichtiges Epithel um den Dotter aus, wobei sie von den sich dorso-ventral streckenden, zirkulären viszeralen Myotuben flankiert werden. Der genaue Zeitpunkt dieser mesenchymal-epithelialen Transition ist in der Literatur umstritten. Reuter et al. (1993) beschreiben die Bildung des Mitteldarmepithels im Anschluss an die Fusion von AMP und PMP während Tepass und Hartenstein (1994) die Ausbildung von Epithelzellen bereits während der Wanderung der Mitteldarmprimordien beobachten. Im Stadium 15 hat sich ein geschlossenes Rohr aus entodermalen Zellen um den Dotter gebildet. Dieser Komplex wird äußerlich von einem Netzwerk aus viszeralen Myotuben umschlossen. Innerhalb dieses Netzwerks bilden die zirkulären Myotuben die innere Schicht aus, der die longitudinale Muskulatur außen aufgelagert ist. Beide Muskeltypen sind über zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Schröter et al., 2006). Im Zuge der regionalen Differenzierung im Stadium 16 unterteilt die viszerale Muskulatur den Mitteldarm in vier Darmkammern. Die Bildung und Position der Mitteldarmkonstriktionen wird dabei von Hox(Homeobox)-Genen reguliert. Darüber hinaus entstehen vier Magenblindsäcke und die Cardia („Proventriculus“) am anterioren Ende der ersten Mitteldarmkammer (Abb. 2.1; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Tremml und Bienz, 1989; Immerglück et al., 1990).

2.2. Die Abhängigkeit der Mitteldarmentwicklung von Interaktionen zwischen Entoderm und viszeraler Muskulatur

Während der Mitteldarmdifferenzierung befinden sich das Entoderm und die viszerale Muskulatur stets in engem Kontakt, weshalb schon länger komplexe Wechselwirkungen zwischen diesen Geweben vermutet wurden. In den bislang durchgeführten Analysen wurde vor allem der Einfluss des zirkulären viszeralen Mesoderms auf die Differenzierung des Mitteldarms untersucht. So unterbleiben die Wanderung der Mitteldarmprimordien und die Ausbildung eines entodermalen Epithels in *twist*-, *bap*- und *bin*-Mutanten, in denen kein viszerales Mesoderm gebildet wird. Auch in Mutanten, mit stark reduzierter viszeraler Muskulatur, differenzieren nur diejenigen Entodermzellen, die im direkten Kontakt zu den Überresten des viszeralen Mesoderms stehen (Reuter et al, 1993; Azpiazu und Frasch, 1993; Tepass und Hartenstein, 1994; Zaffran et al., 2001). Auf der molekularen Ebene konnten Transmembranrezeptoren der Integrinfamilie als potentielle Mediatoren für diese Interaktionen identifiziert werden.

Integrine repräsentieren eine ursprüngliche Klasse von Zelladhäsionsmolekülen, die als heterodimere Komplexe aus einer α - und β -Untereinheit aufgebaut sind (Hynes, 2002).

In *Drosophila* wurden die Integrine ursprünglich als positionsspezifische (PS) Antigene auf Zelloberflächen identifiziert, was sich auch heute noch in ihrer Nomenklatur widerspiegelt (Wilcox et al., 1981; Brower et al., 1984; Brower et al., 1985). Bislang wurden sieben Gene identifiziert, die für insgesamt fünf α - und zwei β -Integrin Untereinheiten sowie deren gewebsspezifische Isoformen kodieren (Brown, 2000). An der Entwicklung des Mitteldarms sind dabei vor allem die beiden β -Untereinheiten β_v und β_{PS} sowie die α -Integrine α_{PS1} , α_{PS2} , und α_{PS3} beteiligt (Martin-Bermudo et al., 1999; Devenport und Brown, 2004). So wird das α_{PS2}/β_{PS} -Heterodimer (auch als PS2-Integrin bezeichnet) in der viszeralen Muskulatur für dessen Funktion als „Substrat“ während der Wanderung der Mitteldarmanlagen benötigt. Dagegen sind PS1- und PS3-Integrin in den Entodermzellen essentiell für deren Migrationsbewegung (Martin-Bermudo et al., 1999). Der Verlust beider β_{PS} -Untereinheiten führt schließlich zum völligen Adhäsionsverlust zwischen den viszeralen Geweben, woraufhin die Wanderung und Epithelialisierung der Entodermzellen unterbleibt (Devenport und Brown, 2004). Integrine gelten als wichtige Rezeptoren für eine Reihe von Liganden und Molekülen an Zelloberflächen oder innerhalb der extrazellulären Matrix (engl. extracellular matrix, ECM), welche unter anderem den Mitteldarm umschließt (Hynes, 1992; Goldstein und Burdette, 1971; Fessler und Fessler, 1989). Aufgrund der charakteristischen ECM-Verteilung um den Mitteldarm und zwischen den viszeralen Geweben stellt sich die Frage nach einer möglichen Beteiligung bestimmter ECM-Komponenten an der Differenzierung des Mitteldarms. Bislang existieren allerdings kaum funktionelle Studien, die sich mit diesem Aspekt der viszeralen Differenzierung auseinandersetzen.

2.3. Die extrazelluläre Matrix von *Drosophila melanogaster*

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein Netzwerk aus unterschiedlichen Makromolekülen, das sich im Interzellularraum von tierischen Geweben ausbildet. Dabei fungiert sie als mechanisches Gerüst zur Verankerung und Stabilisierung von Zellen und begrenzt Gewebe, Organe und imaginale Anlagen. Darüber hinaus ist die ECM aktiv an der Entstehung, Differenzierung und Umgestaltung bestimmter Gewebetypen beteiligt und übernimmt eine wichtige Rolle während der interzellulären Kommunikation. In *Drosophila* lässt sich die ECM vereinfacht in eine äußere und eine innere Fraktion unterteilen. Die äußere Fraktion besteht aus der chitinhaltigen Kutikula, die hauptsächlich von den Epidermiszellen aber auch von intern liegenden Ektodermderivaten sekretiert wird. Die innere Fraktion besteht aus den Basallaminae,

die alle inneren Organe sowie die imaginalen Anlagen umgeben (Broadie et al., 2011). Darüber hinaus sind in der Hämolymphe die Funktionen von Blut und interstitieller Matrix der Wirbeltiere vereint (Fessler und Fessler, 1989).

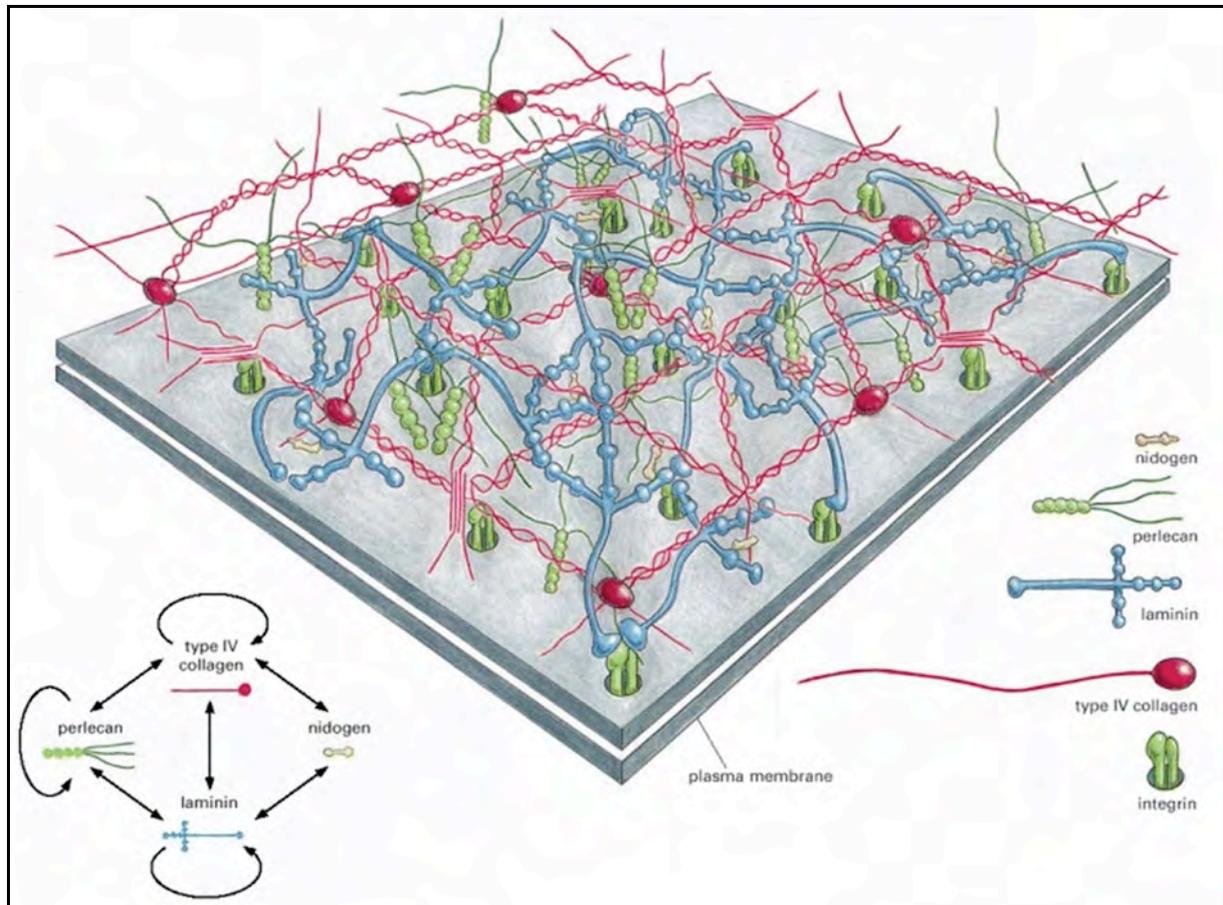


Abbildung 2.2.: Aufbau und molekulare Zusammensetzung der Basallamina. Schematische Darstellung einer Basallamina und der am Aufbau beteiligten Moleküle sowie deren postulierte Interaktionen. Die Basallamina besteht aus einer polymeren Lamininschicht, die von zellulären Rezeptoren wie den Integrinen an der Plasmamembran lokalisiert wird und einem äußeren Netz aus Kollagen IV-Molekülen. Beide Netzwerke sind über das Glykoprotein Nidogen und das Heparinsulfat-Proteoglycan (HSPG) Perlecan miteinander verbunden. Abbildung verändert übernommen aus Alberts, Johnson, Lewis et al., (2002).

Die Basallamina ist eine hoch spezialisierte ECM-Schicht von 50-100 nm Dicke, die sich auf der basalen Seite von Epithelien sowie um Muskeln und Fettgewebe ausbildet (Abb. 2.2). Die Hauptkomponenten der Basallamina sind die Glykoproteine Laminin und Nidogen (auch als Entactin bezeichnet), Kollagenfasern vom Typ IV (auch als Typ IV-Kollagen oder Kollagen IV bezeichnet) und das Heparinsulfat-Proteoglycan (HSPG) Perlecan. Innerhalb der Basallamina schließen sich Lamininmoleküle und Kollagen IV-Fasern zu supramolekularen Netzwerken zusammen, die durch Nidogen und Perlecan miteinander verbunden sind. In dieses Molekülgerüst werden daraufhin weitere ECM-Komponenten gewebsspezifisch eingelagert (Timpl und Brown, 1996; LeBleu et al., 2007). Immunhistochemische Studien an *Drosophila*-

Embryonen offenbarten vor allem eine deutliche Zunahme der viszeralen Expression von Laminin während der Organogenese, weshalb eine Beteiligung dieser ECM-Komponente an der Mitteldarmentwicklung vermutet wird (Kusche-Gullberg et al., 1992; Yarnitzki und Volk, 1995). Laminine sind heterotrimere Glykoproteine mit typischerweise kreuzförmiger Struktur, die sich aus jeweils einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammensetzen (Chung et al., 1979; Rhode et al., 1979; Timpl et al., 1979; Fessler et al., 1987). Im *Drosophila*-Genom kodieren *LamininA* (*LanA*) und *wingblister* (*wb*) für zwei unterschiedliche Laminin α -Untereinheiten, die gewebsspezifisch exprimiert werden (Kusche-Gullberg et al., 1992; Martin et al., 1999). Die β -Kette wird von *Laminin B1* (*LanB1*), die γ -Kette von *Laminin B2* (*LanB2*) kodiert (Montell und Goodman, 1988; Chi und Hui, 1989; Montell und Goodman, 1989). Jeweils eine β -Untereinheit verbindet sich über Disulfidbrücken mit einer γ -Kette zum Kern des Laminintrimers, in den daraufhin eine der beiden Laminin α -Untereinheiten eingelagert wird (Kumagai et al., 1997). Nach ihrem Zusammenbau im Golgi-Apparat werden die Laminintrimere in den interzellularen Raum sekretiert und dort von Rezeptoren an der Zelloberfläche gebunden. Dies führt zur lokalen Anhäufung von Laminintrimeren, die daraufhin zu einem Netzwerk polymerisieren. Die Entstehung dieses Laminin-Netzwerks gilt als initialer Vorgang während des Zusammenbaus der Basallamina (Cognato et al., 1999; Cognato und Yurchenco, 2000). Gegenüber den Wirbeltieren, in denen fünf α -, vier β - und drei γ -Ketten die Bildung von insgesamt 16 unterschiedlichen Laminintrimeren erlauben, sind die möglichen Heterotrimer-Kombinationen in *Drosophila* auf lamininA (entspricht dem LanA/LanB1/LanB2 Trimer) und lamininW (Wb/LanB1/LanB2) beschränkt (Martin et al., 1999). Nullmutationen in *LanA* oder *wb* führen zur embryonalen Letalität und sind mit charakteristischen Phänotypen des Herzens, der somatischen Muskulatur, der Tracheen und des Nervensystems assoziiert. Schwächere Mutationen in *wb* und *LanA* führen in adulten Fliegen zu Defekten des Flügelepithels („wing-blister“ Phänotyp) und in der Rhabdomerorganisation, was die umfassende Bedeutung von Laminin für die Entwicklung von Organismen verdeutlicht (Henchcliffe et al., 1993; Yarnitzki und Volk, 1995; Martin et al., 1999).

Trotz der charakteristischen Verteilung von Laminin um den larvalen Mitteldarm, konnten in den bislang untersuchten Mutanten keine dauerhaften viszerale Störungen nachgewiesen werden (Yarnitzki und Volk, 1995; Martin et al., 1999). Auch Untersuchungen, die sich mit der Funktion von Perlecan und Nidogen während der viszerale Entwicklung auseinandersetzen, wurden bislang nicht vorgestellt. Lediglich Borchiellini et al. (1996) berichten von schweren somatischen und viszerale Muskeldefekten, die durch Kollagen IV-RNA-Interferenz oder die ektopische Expression von Deletionsvarianten einer Kollagen-

Untereinheit induziert wurden. Ob die viszerale Basallamina während der Organogenese des Mitteldarms tatsächlich eine entscheidende Rolle spielen, und welche Funktion die einzelnen ECM-Komponenten dabei wahrnehmen, bleibt somit weitestgehend ungeklärt.

2.4. Vorgegangene Arbeiten und Aufgabenstellung

Nach dem gegenwärtigen Wissensstand nimmt die viszerale Muskulatur eine Schlüsselstellung während der embryonalen Mitteldarmentwicklung ein (Reuter et al., 1993; Azpiazu und Frasch, 1993; Tepass und Hartenstein, 1994; Zaffran et al., 2001). Die Beteiligung des Entoderms oder der viszerale Basallamina an dieser Entwicklung wurde dagegen kaum untersucht. Auch ist nur wenig über die genetischen und zellulären Mechanismen bekannt, die zur Differenzierung der einzelnen viszerale Gewebe führen und die Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Mitteldarmgeweben vermitteln.

Der vorliegenden Arbeit geht die Durchmusterung einer EMS-Fliegenkollektion (Hummel et al., 1999a, b) nach Phänotypen in der viszerale Muskulatur voraus (Stute et al., 2004). Die morphologische Analyse der einzelnen Fliegenstämme erfolgte dabei mit Antikörpern gegen das Zelladhäsionsprotein Fasciclin III (FASIII, Patel et al., 1987), welches ab dem voll verlängerten Keimstreif in der viszerale Muskulatur von *Drosophila* exprimiert wird. In diesem Screen konnten insgesamt vier Klassen von viszerale Mutationen beschrieben werden, die sich unterschiedlich auf die Entwicklung des viszerale Mesoderms auswirken (Stute et al., 2004). Die Linie *3BI-038* repräsentiert dabei den prominentesten Vertreter einer Klasse von Mutationen, die am Ende der Embryonalentwicklung zum Verlust des charakteristischen vierkammerigen Mitteldarms führen, obwohl die frühe viszerale Entwicklung in den Mutanten anscheinend nicht betroffen ist.

Anfängliche genetische und morphologische Analysen legten nahe, dass mindestens zwei viszerale Mutationen in der Linie *3BI-038* vorhanden sind, die zur Ausprägung charakteristischer Mitteldarmphänotypen führen (Wolfstetter et al., 2008). In der nun folgenden Arbeit sollten zunächst die viszerale Mutationen auf dem *3BI-038*-Chromosom durch meiotische Rekombination voneinander getrennt, in separaten Stämmen isoliert und morphologisch analysiert werden. Ausgehend von diesen Befunden sollten die Mutationen mit molekularbiologischen und kreuzungsgenetischen Methoden bestimmten Genen zugeordnet und deren Rollen während der embryonalen Entstehung der Mitteldarmmuskulatur von *Drosophila* identifiziert und beschrieben werden. Möglicherweise lassen sich durch die damit gewonnenen Erkenntnisse weitere Mechanismen aufdecken, die bedeutsam für die Entwicklung der viszerale Muskulatur sind.

3. Material

3.1. Verbrauchsmaterialien

Allgemeiner Laborbedarf:	Carl Roth
	Werkstatt Allg. Zoologie, JLU
Stammhaltung <i>Drosophila melanogaster</i> :	Greiner-One
	3M Deutschland
	Macherey-Nagel
	Werkstatt Allg. Zoologie, JLU

3.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Carl Roth, Merck und Sigma-Aldrich Chemie bezogen. Gaszylinder mit Kohlendioxid wurden von Air Liquide geliefert. Der verwendete flüssige, tiefkalte Stickstoff stammte aus universitätseigener Produktion.

3.3. Geräte

Analysenwaage:	Sartorius CP 1245	Sartorius
Autoklaven:	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systech
	Astell APA 090	Astell Scientific
Beleuchtungseinheit:	Schott KL 1500 LCD	Schott
Brutschrank/Inkubator:	div. Modelle	Memmert
Bunsenbrenner:	IBS Fireboy eco	Integra
CO ₂ -Anästhesierer:		Werkstatt Allg. Zoologie, JLU
Computer:	Microsoft Windows basierte PC- sowie Apple/Mac/OSX-Systeme	
Digitalkameras:	SIS-CC 12	Olympus SIS
	SIS-VC 12	Olympus SIS
Eismaschine:	Scotsman AF100	Enodis
Fluoreszenz-Mikroskope:	Olympus BX 51	Olympus
	Olympus BX 41	Olympus
Fluoreszenz-Stereomikroskop:	Leica MZ10F	Leica Microsystems
Elektrophoresekammern:	Model 40-0708	Peqlab
	Model 40-1214	Peqlab
Geldokumentation:	E-Box Videosystem	Peqlab
Heizblöcke:	Rotilabo-Block-Heater H 250	Carl Roth
	HB-LS1H	VLM Laborshop

Inkubationshaube:	Certomat H	Sartorius
Inkubationsschrank:	Haereus	Fisher Scientific
Konfokalmikroskop:	Leica TCS SP2 AOBS	Leica Microsystems
Magnetheizrührer:	MBT Brand Model L-81	Micro-Bio-Tec-Brand
Magnetrührer:	MBT Brand Model L-71	Micro-Bio-Tec-Brand
Mikrowelle:	Severin Mikrowave 800	Severin Elektrogeräte
Elektrophoresenetzgerät:	Consort E 835 300 V-500 mA	Consort nv
pH-Meter:	pH/ORP Elektrode: HI 211 0	Hanna Instruments
Pipetten (einstellbares Volumen):	Pipetman Classic (div. Modelle)	Gilson
Photometer:	BioRad SmartSpec 3000	Bio-Rad
Präzisionswaage:	Sartorius BL 310	Sartorius
Schüttler:	Heidolph Rotamax 120	Heidolph Instruments
	Certomat R	Sartorius
Stereomikroskop:	M5-71585	Wild Heerbrugg
Tischzentrifugen:	Hettich Mikro 22R	Andreas Hettich
	Hettich Mikro 20	Andreas Hettich
	Centrifuge 5415C	Eppendorf
Vortexer:	MBT Brand L 46	Micro-Bio-Tec-Brand
	Vortex Genie 2 Digital	Scientific Industries
Wasserbad:	Julabo HC-4/10	Julabo Labortechnik
	Julabo EC-BRU/PU (EC 19)	Julabo Labortechnik
Wasseraufbereitungssystem:	Millipore Simplicity Water	Millipore Corporation

3.4. Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist am Anfang des entsprechenden Abschnitts angegeben. Sofern in der allgemeinen Laborpraxis gebräuchlich, enthalten die Auflistungen auch Prozentangaben. Diese beziehen sich entweder auf die Masse einer Festsubstanz (in g) gelöst in 100 ml Lösungsmittel (w/v) oder auf den Anteil einer Flüssigkeit (in ml) an 100 ml Lösungsvolumen (v/v). Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen und Puffer mit Reinstwasser (Typ 1 Reinheitsgrad, erreicht durch die Millipore-Aufbereitung von einfach entionisiertem Wasser) hergestellt.

3.5. Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli* K12 (*E. coli*)

Die verwendeten Nährmedien wurden mit einfach entionisiertem Wasser bereitet und bei 121°C für 15 min autoklaviert.

LB-Medium (Bertani, 1951)

1% (w/v) Bactotrypton
0.5% (w/v) Hefeextrakt
85.5 mM NaCl
pH 7.0

LB-Agar Nährböden

LB-Medium
1.5% (w/v) Agar-Agar (hochrein)

SOB-Medium (Hanahan, 1983)

2% (w/v) Bactotrypton
0.5% (w/v) Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
pH 7.0

SOC-Medium (Hanahan, 1983)

SOB-Medium, autoklaviert
20 mM Glucose

3.5.1. Antibiotikazusätze:

Antibiotika wurden den autoklavierten Nährmedien vor Gebrauch zugesetzt. Im Folgenden wird für diese Medien der Begriff Selektionsmedien bzw. Selektionsplatten verwendet.

Ampicillin	50 µg/ml (aus 100 mg/ml Stammlösung)
Tetracyclin in Flüssigmedien	10 µg/ml (Stammlösung: 12.5 mg/ml in 100% Ethanol)
Tetracyclin in Agar Nährböden	12.5 µg/ml (Stammlösung: 12.5 mg/ml in 100% Ethanol)

3.6. Medien zur Stammhaltung von *Drosophila melanogaster*

Alle *Drosophila* Kulturmedien wurden mit Leitungswasser bereitet.

Maismehlagar

- 6.6% (w/v) Maismehl (Bio-Siegel)
- 4.7% (w/v) Kristallzucker (div. Hersteller)
- 1.7% (w/v) Trockenhefe (*Saccharomyces cerevisiae*)
- 0.75% (w/v) Agar-Agar (dänisch pulverisiert)
- ca. 0.6% (v/v) Rübensirup (Grafschafter Krautfabrik-Josef Schmitz KG)
- 0.33% (v/v) Propionsäure (E 280)
- 0.1% (w/v) Methyl-4-hydroxybenzoat (Nipagin, E 218)

Traubensaftagar

- 25% (v/v) Traubensaft
- 2.6% (w/v) Agar-Agar (hochrein)
- 1.25% (w/v) Kristallzucker
- 0.1% (w/v) Methyl-4-hydroxybenzoat (Nipagin, E 218)

3.7. Enzyme und Puffer

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP), NEB Puffer 3 (Dephosphorylierungspuffer, 10x), Restriktionsendonukleasen, Inkubationspuffer für Restriktionsendonukleasen (10x), T4 DNA-Ligase, T4 DNA-Ligase Puffer (10x), *Thermus aquaticus* (Taq) DNA-Polymerase, Thermo Polymerase (ThermoPol) Reaktionspuffer (10x), DiluentF (Verdünnungspuffer *Taq*-Polymerase, 1x) wurden von New England Biolabs geliefert. Ribonuklease A (RNaseA) wurde von Sigma-Aldrich, Proteinase K von Carl Roth bezogen.

3.8. Standards und Reagenziensätze

DNA-Größenstandards	Ares Bioscience
Deoxynucleotide Solution Mix (dNTPs)	New England Biolabs
DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche
Jetstar Plasmid Kit 2.0	Genomed
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
Illustra GFX Kit	GE Healthcare Europe
TOPO TA Cloning Dual Promoter Kit	Invitrogen
Renaissance TSA Fluorescence Systems	Perkin Elmer Life Sciences
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories

3.9. Antikörper und Seren

3.9.1. Verwendete Primärantikörper:

Name/Antigen (Abkürzung, Referenz)	Spezies, eingesetzte Verdünnung	Herkunft/Bezugsquelle
Anti-Anaplastic Lymphome Kinase (ALK, Englundh et al., 2003)	Meerschweinchen, 1:1000	Ruth Palmer (Umeå University, SE)
Anti β -Galaktosidase (β GAL)	Maus, 1:500	Promega
Anti β -Galaktosidase (β GAL)	Kaninchen, 1:2500	Cappel
Anti β 3-Tubulin (β 3TUB, Leiss et al., 1988)	Meerschweinchen, 1:5000	Renate Renkawitz-Pohl (Philipps Universität Marburg)
Anti Digoxygenin F ^{AB} Fragment (anti-DIG)	Schaf, 1:1000	Roche
Anti Digoxygenin F ^{AB} Fragment, Alkalische Phosphatase konjugiert (anti-DIG-AP)	Schaf, 1:10.000 (Spot-test), 1:750 (<i>whole mount</i>)	Roche
Anti <i>Drosophila</i> Epithelial Cadherin (DE-CAD, Oda et al., 1994)	Maus, 1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Anti <i>Drosophila</i> secreted protein, rich in cystein (dSPARC, Martinek et al., 2002)	Kaninchen, 1:200	Maurice Ringuette (CSB, University of Toronto, CA)
Anti Dystroglycan DG ^{ex8} (DG, Schneider and Baumgartner, 2008)	Kaninchen, 1:500	Martina Schneider (University of Copenhagen, DK)
Anti FasciclinII 1D4 (FASII, Helt und Goodman, nicht publiziert)	Maus, 1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Anti FasciclinIII (FASIII, Patel et al., 1987)	Maus, 1:10	Christian Klämbt (Westfälische Willhelms Universität, Münster)
Anti Filamin1/Cheerio-N-Terminus (FLN, Sokol und Cooley, 2003)	Ratte, 1:500	Lynn Cooley (Yale University, USA)
Monoclonal Antibody 22C10/Anti Futsch (22C10, Zipursky et al., 1984; Hummel et al., 2000)	Maus, 1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Anti Green Fluorescent Protein (GFP)	Kaninchen 1:500	Abcam
Anti Laminin (LAN, Kusche-Gullberg et al., 1992)	Kaninchen 1:500	Liselotte Fessler (MBI, UCLA, USA)
Anti LamininB1 (LANB1, Kumagai et al., 1997)	Kaninchen 1:300	Abcam
Anti LamininB2 (LANB2, Kumagai et al., 1997)	Kaninchen 1:300	Abcam
Anti Macrophage derived protein 1 (MDP1, Hortsch et al., 1998)	Maus, 1:200	Michael Hortsch (CDB, University of Michigan, USA)
Anti Nidogen (NDG, Wolfstetter et al., 2009)	Kaninchen, 1:500	Stefan Baumgartner (Lund University, SE)
Anti Pericardin EC11 (PRC, Chartier et al., 2002)	Maus, 1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Anti Serpent (SRP)	Kaninchen, 1:1000	Rolf Reuter (Eberhard-Karls-

Monoclonal Antibody 2A12/"Anti tracheal lumen" (2A12, Patel und Goodman publiziert von Man- ning und Krasnow, 1993)	Maus, 1:5	Universität Tübingen) Developmental Studies Hybri- doma Bank (DSHB)
Anti WASP-Interactin-Protein (WIP, Berger et al., 2008)	Kaninchen, 1:1000	Ruth Palmer (Umeå University, SE)

3.9.2. Verwendete Sekundärantikörper:

Name/Antigen	Spezies, eingesetzte Verdünnung	Herkunft/Bezugsquelle
Anti Maus-IgG, biotinyliert	Ziege, 1:500	Vector Laboratories
Anti Meerschweinchen-IgG, biotinyliert	Ziege, 1:500	Vector Laboratories
Anti Kaninchen-IgG, biotinyliert	Ziege, 1:500	Vector Laboratories
Anti Schaf-IgG, biotinyliert	Kaninchen, 1:500	Vector Laboratories
Anti Maus-IgG, Cy2-konjugiert	Ziege, 1:40	Dianova
Anti Kaninchen-IgG, Cy2-konjugiert	Ziege, 1:40	Dianova
Anti Meerschweinchen-IgG, Cy2- konjugiert	Ziege, 1:40	Dianova
Anti Ratte-IgG, TRITC-konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova
Anti Maus-IgG, Cy3-konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova
Anti Kaninchen-IgG, Cy3-konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova
Anti Meerschweinchen-IgG, Cy3- konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova

3.9.3. Verwendete Seren:

Name	eingesetzte Verdünnung	Herkunft/Bezugsquelle
Ziegen (Normal Goat) Serum	1:20	Sigma-Aldrich
Schaf (Normal Sheep) Serum	1:20	Sigma-Aldrich

3.10. Einbettungsmedien und Immersionsöl für die Mikroskopie

Fluoromount-G	Southern Biotech
Euparal	Carl Roth
Immersionsöl (DIN 58884/ISO 8036/1)	Leica Microsystems

3.11. Verwendete DNA-Vektoren

pUC19 Klonierungsvektor (Yanisch-Perron et al., 1985). Herkunft: Invitrogen

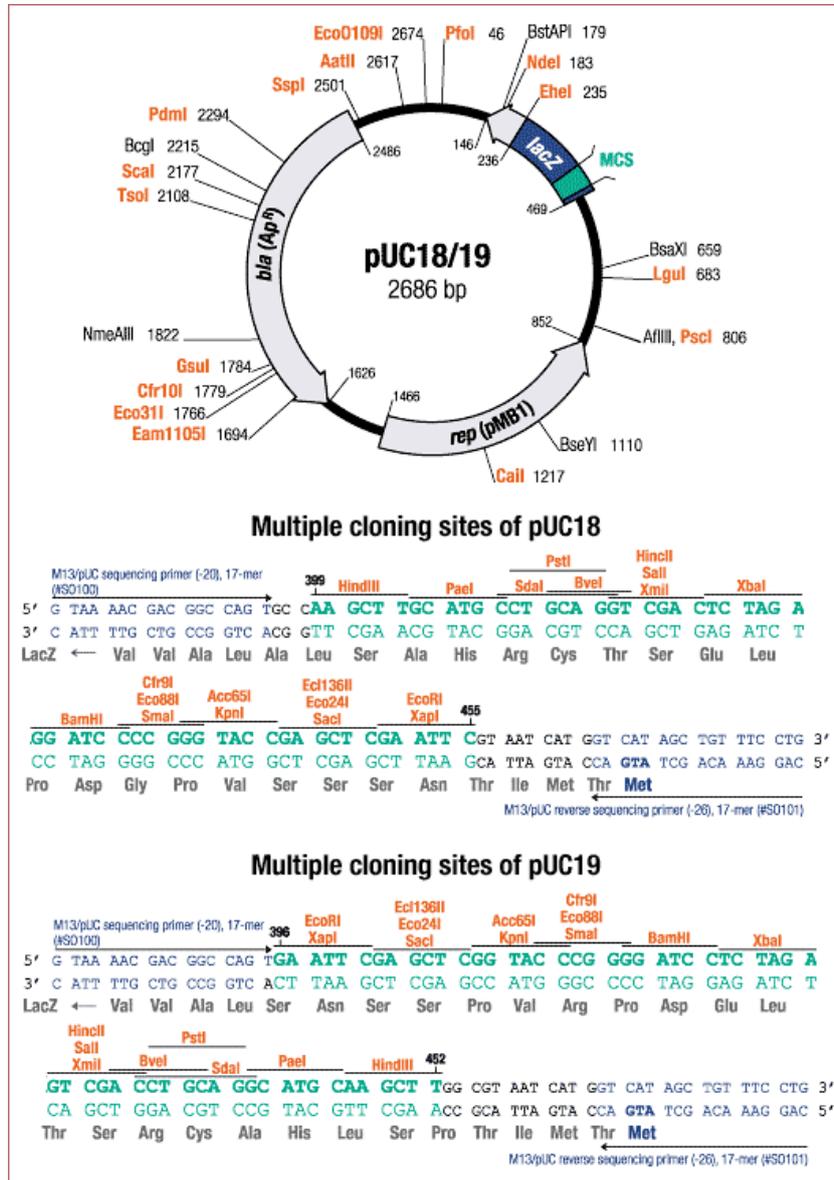


Abb. 3.1: Vektorkarte der Plasmide pUC18 und pUC19. Quelle: Fermentas (<http://www.fermentas.com>, 23.03.2011)

pBluescript II SK (-) Klonierungsvektor (Stratagene). Herkunft: *Drosophila* Genomics
Ressource Center, DGRC

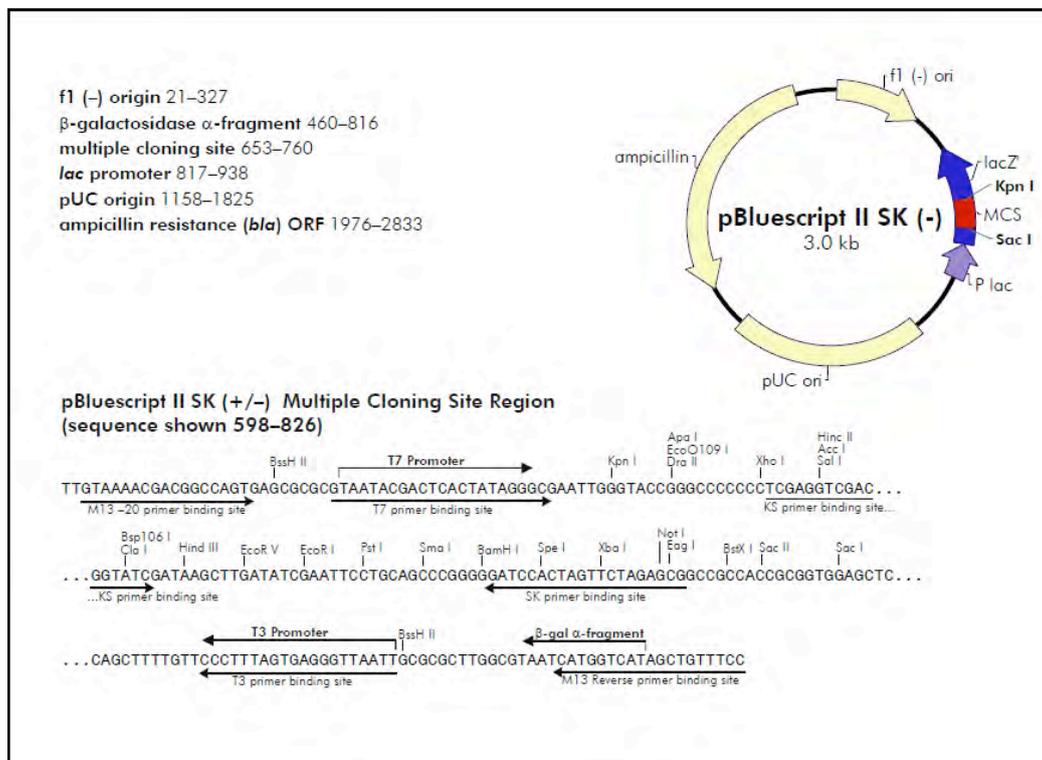


Abb. 3.2: Vektorkarte des pBluescript II (-)-Plasmids. Quelle: Stratagene

(<http://www.genomics.agilent.com>. 23.03.2011)

pCRII-TOPO Klonierungsvektor (Invitrogen). Herkunft: Invitrogen

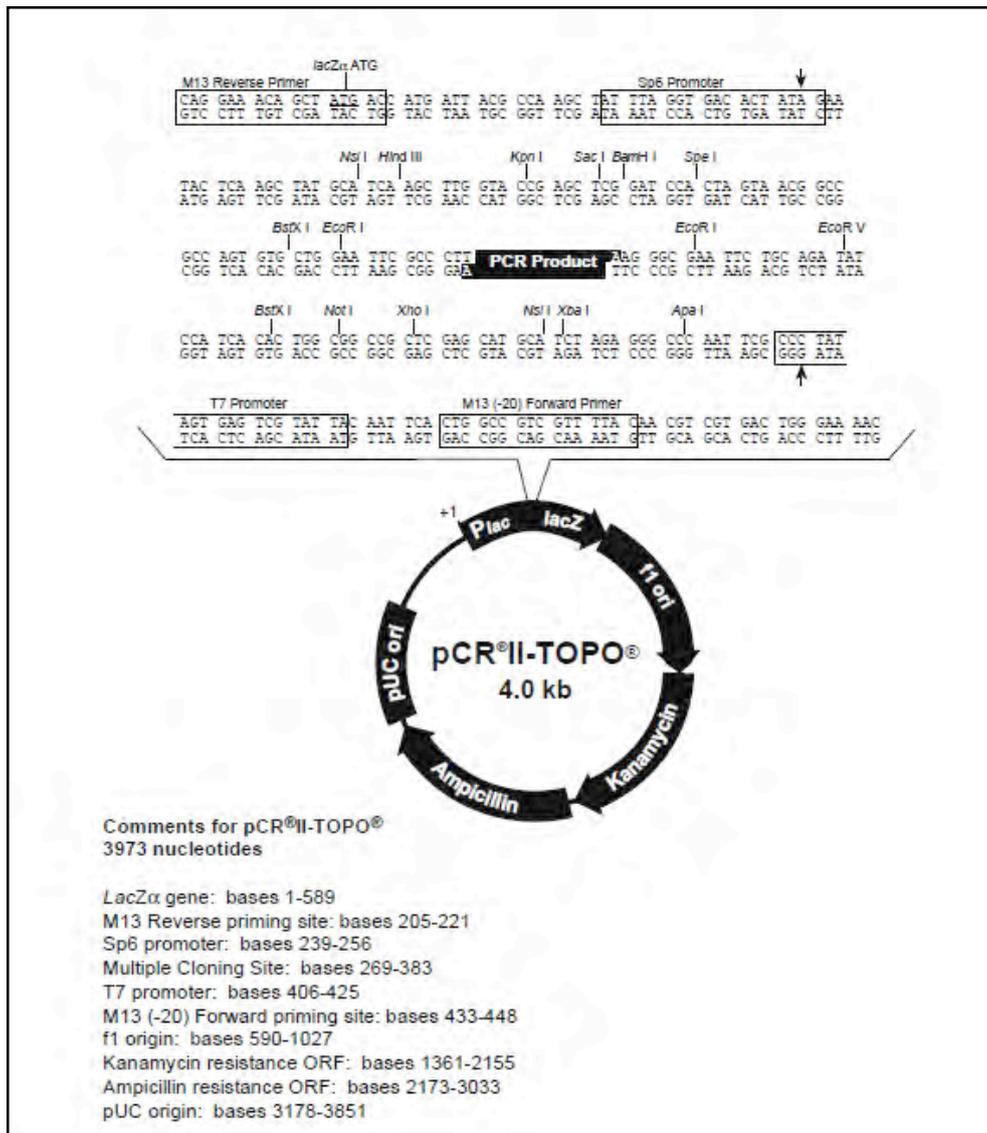


Abb. 3.3: Vektorkarte des pCRII-TOPO-Plasmids. Quelle: Invitrogen

(<http://www.invitrogen.com>, 23.03.2011)

pUAST Transformationsvektor (Brand und Perrimon, 1993). Herkunft: Andrea Brand (Gurdon Institute, University of Cambridge)

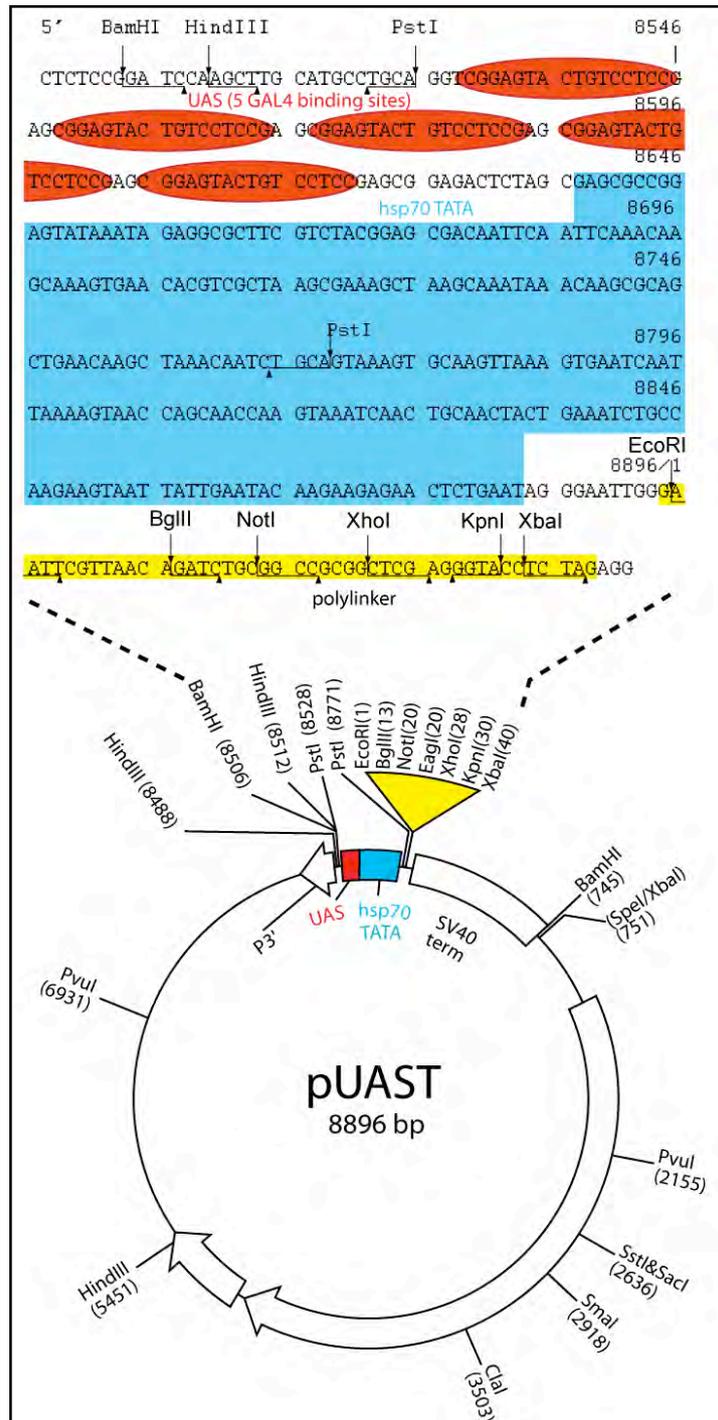


Abb. 3.4: Karte des pUAST-Transformationsvektors. Quelle: Internetpräsenz der AG Brand (<http://www.gurdon.cam.ac.uk/~brandlab>, 23.03.2011)

3.12. Verwendete cDNA-Klone

LD15803. Herkunft: *Drosophila* Genomics Ressource Center (DGRC).

Klon aus der Gold-cDNA-Bank des Berkeley *Drosophila* Genome Projekts (BDGP). Enthält ein 5737 bp großes Fragment der *LamininB2* (CG3322)-cDNA (Gewebequelle: 0-22 Stunden alte *D. melanogaster* Embryonen) in dem Vektor pBluescript II SK (-).

3.13. Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Tab. 3.1: Sequenzen und Hybridisierungstemperaturen der verwendeten Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Hybridisierungstemperatur
<i>huckebein</i> PCR- und Sequenzierprimer		
hkb_1F	CAGGATCTGGTTAACGGGAAGTGACA	65°C
hkb_1R	GACTGGTTATGATATTCGGCACATGTG	65°C
hkb_2F	CAGCTTTAGTATAACTTAGACGTAAATC	60°C
hkb_2R	GTACTCATACTTTATGGCTACTGAGA	60°C
hkb_3F	CAGATCGCTGGAATGCAGGGTCGCG	65°C
hkb_3R	CAACGGCCAGCTGAAGGGCCACATC	65°C
hkb_4F	GTTCGCCTGCAGAACAGAATGGAGAT	65°C
hkb_4R	GCCGCCGCCACCGCATCCTTGGC	65°C
hkb_5F	GTAGAGATCGCTGGCGGCCGACAG	65°C
hkb_5R	GATTAACCTGCATCCCCGCAAACC	65°C
hkb_6F	GTAATCGCCTCCGGCTCCTGCTTCA	65°C
hkb_6R	GTGAGTGTGTATGTGTGTGCGCGTG	65°C
Primer zur Amplifikation von <i>LamininB2</i> -Matrizen-DNA für die <i>in situ</i> -Sondenherstellung		
5'_lanB2_Exon6	GAGACTGGAATCTGCTTCTGCAAGGA	64°C
3'_lanB2_Exon6	GAACCAAAGTAACCCTTCGGGCAC	64°C
<i>LamininB2</i> PCR- und Sequenzierprimer		
5'_LanB2_Exon0	GCCGCAAGTACTCCAACCAGATCCG	64°C
3'_LanB2_Exon0	CTGGCTGGTTAAAAGGCAACAACA	64°C
5'_lanB2_Exon0/1	GCGATTTGCTCGGCGAACTAATTAATA	62°C
3'_lanB2_Exon0/1	CTCTCACTCGAATTGACCCAGCCCAA	62°C
5'_lanB2_Exon2/3	GTAAACTTTCAGTTGTACGAGTAATTA	59°C
3'_lanB2_Exon2/3	GTGATGTCATAGGATTTTCCTGGGTTT	59°C

5′_lanB2_Exon4	GTAAGCATAATAGATGATGAGTTTAAAAA	56°C
3′_lanB2_Exon4	GCATAGAAGTGGAAGGAAGTATAACTTT	56°C
5′_lanB2_Exon5	GTACCTGATCAACTGTATAAATAGTTCT	59°C
3′_lanB2_Exon5	CATCTATGACAGAAATCAAAGTTTAGC	59°C
LanB2_E6_1_F	GAGACTGGAATCTGCTTCTGCAAGGA	64°C
LanB2_E6_1_R	GGTTGCCACTGGTAATCATGATGTTCA	64°C
LanB2_E6_2_F	GTGCCTCCTACAACAGGGATCTGAAA	64°C
LanB2_E6_2_R	CCCAGGGCATTTCGGTAGAATCCCT	64°C
LanB2_E6_3_F	GTGAGTCCTGTGCTCCAGGCTATCG	64°C
LanB2_E6_3_R	GACTTGGTCACATCGCGTGATACTCT	64°C
LanB2_E6_4_F	CAATGCCGTGGGCAATTGCAACCGG	64°C
LanB2_E6_4_R	GTTATAGCAATCGGGCAATCGATGC	64°C
LanB2_E6_5_F	GGTGCGATCAGTGCGAGAACTATTTC	64°C
LanB2_E6_5_R	GGCCAAAGCCTGAGCACCTTCGTCA	64°C
LanB2_E6_6_F	GTCATCGATGATCTTCACAAGCACCT	62°C
LanB2_E6_6_R	G TTCATTGGCGGCCACTGCATCCT	62°C
LanB2_E6_7_F	GCAGCTAAAGATCGGCACCGAGCTC	64°C
LanB2_E6_7_R	GCTGATCAGGCTTTGCGCATTCTGAA	64°C
LanB2_E6_8_F	CCACGACAAGGCTACCAAGGCAGTG	64°C
LanB2_E6_8_R	CTCATCCTTGATGGCCGTCAGGTCG	64°C
LanB2_E6_9_F	CAAAGCCAATGAGACCAAGGTGGCT	60°C
LanB2_E6_9_R	CTCGTCTCAGATCTTCGTTCTTAGTT	60°C
LanB2_E6_10_F	CAGCGCACCATTCAGAAGAATCTGAT	64°C
LanB2_E6_10_R	GACTTCAGGTGGAGCTACGGTAGAG	64°C
LanB2_E6_11_F	GATACAAGAGGATGGATGATGGCCAC	60°C
LanB2_E6_11_R	GTTTCATCGACTCTACTTTACGTTACATTT	60°C
Sonstige Primer		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	
pUA5xB (pUAST 5′MCS)	ATCTCTGTAGGTAGTTTGTCC	
pUA3EC (pUAST 3′MCS)	ACTGCAACTACTGAAATCTGCC	

M13F(-20)	GTAAAACGACGGCCAGC	55°C
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	55°C

3.14. Bakterienstämme (*Escherichia coli* K12)

XL-1 Blue (Bullock *et al.*, 1987)

NEB 5 α (New England Biolabs)

One Shot TOP10 (Invitrogen)

3.15. Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Fliegenlinien von den Stammsammlungen des Bloomington *Drosophila* Stock Centers (Indiana University, USA), des *Drosophila* Genetic Resource Centers (DGRC, Kyoto Institute of Technology, Japan), des Vienna *Drosophila* RNAi Centers (VDRC, Österreich) und von FlyTrap (Yale University, USA) bezogen. Die Nomenklatur der Genotypen erfolgt gemäß den Richtlinien der „Genetic nomenclature for *Drosophila melanogaster*“ des Flybase-Konsortiums (McQuilton *et al.*, 2012; <http://flybase.org/>). Im Folgenden sind nur Stämme und Allele aufgelistet, sofern diese von anderen Quellen bezogen wurden.

3B1-038 (Hummel *et al.*, 1999a, b), **bagpipe-Gal4.3** (*bap-Gal4*, Zaffran *et al.*, 2001), **bagpipe-lacZ** (*bap-lacZ*, Azpiazu and Frasch, 1993), **crocodile-lacZ** (*croc-lacZ*, Häcker *et al.*, 1995), **daughterless-Gal4** (*da-Gal4*, Wodarz *et al.*, 1995), **handC-GFP** (*hand-GFP*, Sellin *et al.*, 2006), **Laminin^{A9-32}** (*Lan^{A9-32}*, Henchcliffe *et al.*, 1993), **rP298-lacZ** (*rP298*, Nose *et al.*, 1998), **serpent^{9L}** (*srp^{9L}*, Jürgens *et al.*, 1984), **Thrombospondin^{D77}** (*Tsp^{D77}*, Chanana *et al.*, 2007), **Thrombospondin^{D79}** (*Tsp^{D79}*, Chanana *et al.*, 2007), **wingblister^{HG10}** (*wb^{HG10}*, Ashburner *et al.*, 1982), **wingblister^{SF25}** (*wb^{SF25}*, Woodruff and Ashburner 1979).

3.16. Verwendete Software

Adobe Photoshop CS, AdobeReader/Writer 9

AnalySIS 2.3

Leica Confocal Software LCSTM

Vector NTI Advance 10.3.0

Chromas 2.33

CLC Free Workbench 4.5.1

Microsoft Office (2003-2010)

EndNote Windows Version 9

Adobe Systems

Olympus

Leica Microsystems

Invitrogen

Technelysium Pty Ltd

CLC Bio

Microsoft

Thomson ResearchSoft

4. Methoden

4.1. Agarosegelelektrophorese

Ladepuffer (10x)

0.25% (w/v) Bromphenolblau, 50% Glycerin (v/v), 60 mM EDTA

TAE Puffer (50x)

2 M Tris, 5.7% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8.5

Für die Herstellung von 0.8-1.6% Agarosegelen zur analytischen oder präparativen Gelelektrophorese wurde Agarose in 1x TAE Puffer (Verdünnung einer 50x TAE Stammlösung mit einfach entionisiertem Wasser) aufgenommen und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.4 µg/ml versetzt und in eine entsprechend vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit 1x TAE als Laufpuffer überschichtet. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/10 VT Ladepuffer gemischt, um die Dichte der DNA-Lösungen gegenüber dem Laufpuffer zu erhöhen und so das Absinken in die Geltaschen zu ermöglichen. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurden zusätzlich DNA-Größenstandards (engl. DNA-Markers/Ladders) aufgetragen. Im elektrischen Feld wandern die DNA-Fragmente in den Proben zur Anode und werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. In Abhängigkeit von der Agarosekonzentration bewegen sich auch dem Ladepuffer zugesetzte, negativ geladene Farbstoffe proportional zu DNA-Fragmenten bestimmter Größe und ermöglichen so eine Abschätzung über den Fortschritt der Gelelektrophorese. Während der Gelelektrophorese interkaliert das im Gel enthaltene Ethidiumbromid mit der Proben-DNA und kann anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

4.2. DNA-Präparation aus wässrigen Lösungen

4.2.1. Natriumacetat-Ethanol fällung

Eine wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 VT einer 3 M Natriumacetat Lösung (pH 5.5) versetzt. Anschließend wurden 2-3 Volumina reines Ethanol (auf -20°C vorgekühlt) zu dem Ansatz gegeben, und die darin enthaltenen Nukleinsäuren bei -20°C für mindestens eine Stunde gefällt. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C und 14.000 UpM für 30 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die präzipitierte DNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen Reinstwasser gelöst.

4.2.2. Isopropanolfällung

Die Probenlösung wurde mit 0.7 VT Isopropanol vorsichtig vermischt und die DNA bei RT für 5-15 min gefällt. Anschließend wurde der Ansatz bei 10°C und 14.000 UpM für 30 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde danach zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in Reinstwasser gelöst.

4.2.3. Aufreinigung mit dem Illustra-GFX-Reagentiensatz

(GE Healthcare, Illustra-GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit)

Die Verwendung des Reagentiensatzes erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4.3. DNA-Isolation aus Agarosegelen

(Qiagen, MinElute-Gel-Extraction-Kit)

Die Verwendung des Reagentiensatzes erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4.4. Präparation genomischer DNA aus Fliegen

(Berkeley *Drosophila* Genome Project, BDGP)

Lithiumchlorid/Kaliumacetat (LiCl/KAc)-Lösung

4.28 M LiCl, 1.44 M KAc (frisch bereitet aus 8 M Stammlösungen)

Puffer A

100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% (w/v) SDS

Bis zu 15 Fliegen wurden ätherisiert und in einem 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß gesammelt. Pro Tier wurden 2.5 µl Puffer A zugegeben und die Fliegen auf Eis mit einem Pistill homogenisiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Puffer A auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt. Das Homogenat wurde danach im Wasserbad bei 65°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden 800 µl der LiCl/KAc Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde durch mehrfaches Invertieren des Mikroreaktionsgefäßes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 14.000 UpM und RT für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zwei neue Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, mit je 0.7 VT Isopropanol versetzt und die DNA für 5-10 min bei RT gefällt. Anschließend wurde die DNA bei 14.000 UpM und 10°C für 30 min präzipitiert zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in Reinstwasser (5 µl je eingesetzter Fliege) gelöst.

4.5. Photometrische Analyse von gereinigten Nukleinsäuren

Die spektrale Absorption von Nukleinsäuren im UV-Bereich kann zur Quantifizierung der Proben-DNA (oder RNA) genutzt werden. Dazu wurde die Absorption einer wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) gemessen. Aus der ermittelten Absorption (optische Dichte; OD) kann bei einem Lichtweg von 1 cm in der Quarzküvette die Nukleinsäurekonzentration der Lösung mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt werden:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \approx \text{OD}_{260} * \text{Multiplikationsfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der angegebene Multiplikationsfaktor beträgt bei einzelsträngiger DNA und Oligonukleotiden 33, bei Doppelstrang-DNA 50 und bei RNA 40. Die starke Lichtabsorption aromatischer Verbindungen bei $\lambda=280$ nm ermöglicht es zudem die Reinheit der Proben-DNA durch den Quotient aus OD_{260} und OD_{280} auszudrücken. Bei Werten unter 1.6 gilt die DNA in der Probe als stark verunreinigt.

4.6. Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

4.6.1. Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einem Ansatzvolumen von 20-100 μl wurde die zu schneidende DNA mit der entsprechenden Menge des jeweiligen Restriktionsenzym und dem vom Hersteller empfohlenem Puffersystem für ein bis drei Stunden bei der optimalen Reaktionstemperatur des Restriktionsenzym inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Hitze (meist 65°C für 20 min) inaktiviert. Konnte das verwendete Enzym nicht vollständig durch Hitze inaktiviert werden, wurde die geschnittene DNA entsprechend aufgereinigt (siehe 4.2 und 4.3).

4.6.2. Dephosphorylierung von freien 5'-Enden

Um die Religation bereits geschnittener Plasmidvektoren zu verhindern, können diese durch alkalische Phosphatasen wie CIP (engl. Akronym für: calf intestinal phosphatase) an ihren freien 5'-Enden dephosphoryliert werden. Pro μg geschnittener Plasmid-DNA wurden 0.2 U CIP verwendet. Für die Dephosphorylierung wurden Plasmid-DNA und Enzym in 1x Dephosphorylierungspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Da die CIP nicht komplett hitzeinaktivierbar ist, und zudem in geringem Maß durch Exo- und Endonukleasen verunreinigt sein

kann, empfiehlt es sich, die dephosphorylierte DNA durch Agarosegelelektrophorese aufzureinigen und aus dem Agarosegel zu präparieren (4.3).

4.6.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Passagier-DNA (Insert) mit einem linearisierten und dephosphorylierten Vektor erfolgte über Nacht (üN) bei 4°C in einem Ansatzvolumen von 10 µl bis maximal 20 µl. Pro Ligation wurden 10-50 ng Vektor, 1/10 VT Reaktionspuffer und 1 U T4 DNA-Ligase verwendet. Um die Konkaterisierung mehrerer Passagier-DNA-Fragmente in einem Vektor zu vermeiden sollte die Menge an eingesetzter Insert-DNA äquimolar (im Verhältnis 1:1) zur Vektor-DNA berechnet werden. Um die Ligationseffizienz gegebenenfalls zu erhöhen, kann die Passagier-DNA auch im Überschuss (im Verhältnis von 2:1 bis 8:1) eingesetzt werden. Unter Berücksichtigung einer durchschnittlichen molaren Masse von 660 g/mol für ein Basenpaar doppelsträngiger DNA (dsDNA) lässt sich die molare Masse beliebiger DNA-Moleküle anhand folgender Formel berechnen:

$$\text{dsDNA} \left[\frac{\text{ng}}{\text{pmol}} \right] = \text{Basenpaare} \times 0,66 \left[\frac{\text{ng}}{\text{pmol}} \right]$$

Alternativ kann auch diese Formel zum Ermitteln der Passagier-DNA Menge genutzt werden:

$$\text{Vektor}[\text{ng}] \times \frac{\text{Basenpaare(Insert)}}{\text{Basenpaare(Vektor)}} \times \text{Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Insert}[\text{ng}]$$

4.6.4. Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem TOPO TA-Dual-Promoter-System

(Invitrogen, TOPO TA Cloning-Dual-Promoter-Kit)

Die Verwendung des Reagentiensatzes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Menge an einzusetzendem PCR-Produkt kann anhand der unter 4.6.3 angegebenen Formeln berechnet werden. Der Hersteller empfiehlt für eine Klonierung mit 1 µl TOPO-Plasmidlösung (entspricht 10 ng Vektor-DNA) ein Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1.

4.6.5. Klonierung eines *UAS-LamininB2 (UAS-LanB2)*-Transformationsvektors

Der cDNA-Klon LD15803 (3.12.) enthält ein 5737 bp Fragment der *LamininB2*-cDNA, das bereits mit Hilfe von speziellen Adapterprimern in den pBluescript_SK(-) Vektor (3.11.) kloniert worden war (<http://www.fruitfly.org/EST/faq.html>). Der enthaltenen *LanB2*-Passagier-DNA wurde dabei an ihrem 3'-Ende ein künstlicher, 18 bp langer Poly-A Schwanz angefügt.

Am 5'-Ende fehlen dagegen die ersten 20 Basen der annotierten *LanB2*-cDNA (flybase Datenbank). Diese Basen sind nicht proteinkodierend und stehen nicht im Zusammenhang mit potentiellen Lokalisationssequenzen oder dem Translationsstartpunkt. Unter Ausnutzung der Schnittstellen für EcoRI und XhoI wurde die *LamininB2*-cDNA gerichtet in den Transformationsvektor pUAST (3.11.) kloniert. Die Basenabfolge und Orientierung im Vektor wurde durch Sequenzierung mit pUA5xB- und pUA3EC-Primern (3.13.) überprüft (Appendix) und der pUAST-*LanB2*-Vektor zur Injektion vorbereitet.

4.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

(Saiki et al., 1985, Mullis und Faloona 1987)

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur spezifischen und effizienten Amplifikation von definierten Nukleinsäurefragmenten aus geringen Ausgangsmengen von DNA. Voraussetzung für diese enzymatisch katalysierte Reaktion sind Oligostartermoleküle (Primer), die komplementär zu den Randbereichen des zu synthetisierenden DNA-Fragments sind und mit ihren 3'-Enden in die Richtung des jeweils anderen Primers zeigen. Nach dem Aufschmelzen der DNA (Denaturierungsschritt) hybridisieren die Primer mit den jeweils komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge (Annealing) und werden in einem Elongationsschritt durch eine thermostabile DNA-Polymerase in 3'-Richtung verlängert. Durch sich mehrfach wiederholende Reaktionszyklen aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird schließlich ein PCR-Fragment exponentiell vervielfältigt, dessen Länge durch die 5'-Enden der verwendeten Primer definiert ist.

Für Standard-PCR-Reaktionen wurde ein Thermocycler entsprechend den folgenden Angaben programmiert:

Deckel vorheizen (optional):	110°C
Denaturierungsschritt (optional)	5 min bei 95°C
Anzahl der PCR Zyklen:	35
Zusammensetzung eines PCR Zyklus:	
(I) Denaturierung (Denaturation)	1 min bei 95°C
(II) Primerhybridisierung (Annealing)	1 min (Hybridisierungstemperaturen siehe 3.11)
(III) Elongation (Extension)	1 min pro 1,4 kb bei 72°C*
Abschließende Elongation	10 min bei 72°C

*Bei der Ermittlung der Elongationszeit für den PCR Zyklus wurden die Größe des zu erwartenden PCR-Produkts und die vom Hersteller angegebene Prozessierungsrate für die *Taq*-Polymerase (1 kb PCR-Produkt in 1 min bei 68°C) berücksichtigt.

Ein PCR-Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 50 µl und enthielt die folgenden Komponenten:

Matrize (Template)

entweder aufgereinigte Plasmid-DNA	1-5 ng
oder genomische DNA	50-500 ng

Oligostartermoleküle (Primer)

Sense(„Sinn-“) Primer	20-25 pmol
Antisense(„Gegensinn-“) Primer	20-25 pmol

Desoxynukleotide (dNTPs)

dATP, dCTP, dGTP und dTTP	jeweils 10 nmol
---------------------------	-----------------

ThermoPol-Reaktionspuffer (10x)	1/10 Volumen
--	--------------

Taq-DNA-Polymerase	1-5 U
---------------------------	-------

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Proben auf 4°C gekühlt und bei 2-8°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.8. Markierung von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription

(Roche DIG RNA Labeling and Detection Kit)

Für die *in vitro*-Synthese von RNA-Molekülen aus einer DNA-Matrize können spezielle Transkriptionsvektoren benutzt werden, deren Polylinker-Region von Promotorbereichen bakteriophager RNA-Polymerasen flankiert ist. Wird eine Passagier-DNA in den Polylinker-Bereich kloniert, können unter Verwendung der entsprechenden Polymerase einzelstrangspezifische RNA-Sonden transkribiert werden. Die Verwendung von Digoxygenin (DIG)-modifizierten Nukleotiden im Reaktionsansatz ermöglicht dabei den späteren immunhistochemischen Nachweis der RNA-Sonde (4.9 sowie 4.11.9).

Um die Transkription von Plasmid-DNA während der *in vitro*-Sondensynthese zu minimieren, wurde die DNA-Matrize entweder durch Spaltung des Transkriptionsvektors mit Restriktionsendonukleasen oder in einer PCR-Reaktion hergestellt.

Herstellung von Matrizen-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur Herstellung der Matrizen-DNA wurden zwei Ansätze mit je 3-5 µg des Transkriptionsvektors durch spezifische Schnitte in der Polylinker-Region entweder 5' oder 3' von der ungerichtet klonierten Passagier-DNA linearisiert (4.6.1). Die Matrizen-DNA wurden im Anschluss durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (4.3) und in 15 µl Reinstwasser gelöst.

Herstellung von Matrizen-DNA in einer PCR-Reaktion

Dazu wurden 5 ng Plasmid-DNA in einer PCR-Reaktion (4.7) zusammen mit Primern eingesetzt, die eine Vervielfältigung des kompletten Passagier-DNA Fragments sowie der angrenzenden Promotorbereiche ermöglichten. Das entstandene PCR-Produkt konnte somit gleichermaßen als Matrizen-DNA in der *in vitro* Transkription von *sense*- und *antisense*-Sonden eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der Einsatz vergleichsweise geringer DNA-Templatmengen in der anschließenden *in vitro*-Transkription. Das PCR-Produkt wurde entsprechend aufgereinigt (4.2) und in 25 µl Reinstwasser gelöst.

***in vitro*-Transkription**

Für die *in vitro*-Sondensynthese wurden 1-3 µg linearisierte Plasmid-DNA oder 100-200 ng des aufgereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Die Matrizen-DNA wurde zusammen mit 2 µl DIG RNA-Labeling Mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer und 1 µl der entsprechenden RNA-Polymerase (20 U/µl) in einem Ansatzvolumen von 20 µl für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

4.8.1. Herstellung von *LamininB2*-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

In einer PCR-Reaktion mit den Primern 5' *lanB2_Exon6* und 3' *lanB2_Exon6* (3.13.) wurde zunächst ein ca. 1 kb großes Sondentemplate aus dem *LamininB2*-cDNA Klon LD15803 (3.12.) amplifiziert und ungerichtet in den pCRII-TOPO-Vektor (3.11) kloniert. Die Matrizen-DNA wurde entweder durch Restriktion (4.6.1.) des TOPO-Vektors mit BamHI (für T7-Sonden) bzw. XhoI (für SP6-Sonden) oder durch PCR (4.7.) mit den Primern M13F(-20) und M13R (3.13.) hergestellt. Nach der *in vitro*-Transkription (siehe oben) mit den RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7 wurden die jeweiligen SP6- und T7-Sonden durch Agarosegelelektrophorese (4.1.), photometrische Analyse (4.5.) sowie den Spot-Test (4.9.) überprüft. Die Überprüfung der Sondenspezifität sowie die Zuordnung von *sense*- und *antisense*-Sonden erfolgte durch die *in situ*-Hybridisierung (4.11.9.) an *white*¹¹¹⁸-Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die *antisense*-Sondenspezifität wurden zusätzlich an homozygoten *Df(3L)Exel6114*-Embryonen getestet, in denen *LanB2* sowie 29 weitere, vorhergesagte Genloci deletiert sind (siehe auch 5.3.2).

4.9. Überprüfung der Markierungseffizienz (Spot-Test)

(Protokoll verändert übernommen aus dem Roche „DIG Application Manual“, 4. Edition)

BCIP-Stammlösung

170 mM 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) gelöst in Dimethylformamid. Lagerung bei -20°C im Dunkeln

Blocking-Lösung

1% (w/v) Blocking Reagent (Roche) gelöst in 1x Maleinsäurepuffer

DIG1-Puffer

100 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl

DIG2-Puffer

0.5% (v/v) Blocking-Lösung in DIG1-Puffer

DIG3-Puffer 100 mM Tris/HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

Hybridisierungspuffer

50% (w/v) Formamid deionisiert, 25% (v/v) 20x SSC, 0.05% (v/v) Heparin, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 6.5

1x Maleinsäurepuffer

100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5

NBT-Stammlösung

92 mM Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) gelöst in 70% (v/v) Dimethylformamid. Lagerung bei -20°C im Dunkeln

20x SSC

3 M NaCl, 300 mM Na₃Citrat

Jeweils 1 µl Aliquots einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:5000 in Reinstwasser) der DIG-markierten RNA-Sonde wurden auf eine Nylonmembran (GE Healthcare Europe, München) punktförmig aufgetragen. Durch zweistündiges Backen bei 80°C wurde die RNA mit der Membran kovalent vernetzt. Anschließend wurde die Membran in eine Petrischale überführt und in 15-20 ml DIG1-Puffer für 2 min äquilibriert. Die Äquilibrierlösung wurde entfernt und die Membran für 30 min in 15-20 ml DIG2-Puffer geblockt. Danach wurde die Membran für 30 min bei RT und unter leichtem Schwenken in einer 1:10.000 Verdünnung des anti-DIG-AP-Antikörpers in DIG2-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Membran zweimal für jeweils 15 Minuten in DIG1-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 min in 10 ml DIG3-Puffer äquilibriert. Währenddessen wurden 35 µl BCIP und 45 µl NBT separat in jeweils 5 ml DIG3-Puffer verdünnt. Der DIG3-Puffer wurde von der Membran entfernt und die Farbreaktion durch Zugabe der

vorbereiteten BCIP- und NBT-Lösungen gestartet. Die Färbung erfolgte für 5 min im Dunkeln. Unmittelbar danach wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Reinstwasser gestoppt. Sonden, die nach 5 min Inkubationszeit auch in der höchsten Verdünnung von 1:5000 ein gut sichtbares Signal zeigten, wurden bis zur weiteren Verwendung in der *in situ*-Hybridisierung (4.11.9) mit 1x Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:10 verdünnt und bei -20°C gelagert.

4.10. Arbeiten mit *Escherichia coli* K12

4.10.1. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

(Rubidium Chlorid Methode. Protokoll übernommen von New England Biolabs)

TFBI (Transformation Buffer I)

100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5.8 (einstellen mit 0.1 M Essigsäure). Lösung steril filtrieren und bei 4°C lagern.

TFBII (Transformation Buffer II)

75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS oder PIPES, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin, pH 6.5 (einstellen mit 1 N KOH). Lösung steril filtrieren und bei 4°C lagern.

Mit einer sterilen Impföse wurde ein Aliquot aus einer Bakterienkultur im Verdünnungsausstrich auf eine LB-Selektionsplatte aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Bakterienkolonie von der Platte isoliert und $\bar{u}N$ in 3 ml LB-Medium bei 37°C auf dem Inkubationsschüttler (~200 UpM) kultiviert. Mit dieser $\bar{u}N$ -Kultur wurden 250 ml SOB-Medium (auf 37°C vorgewärmt) im Verhältnis 1:100 angeimpft und auf einem Inkubationsschüttler (~200 UpM) bei 37°C kultiviert. Beim Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0.5-0.6 wurde die Bakterienlösung für 15 min auf Eis gekühlt und danach 10 min lang bei 4°C und 6000 UpM zentrifugiert. Das SOB-Medium im Überstand wurde gründlich abgenommen und die Zellen in 80 ml eiskaltem TFBI resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 10 min bei 4°C und 6000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem TFBII aufgenommen und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 200 μ l Aliquots in 1.5 ml Mikroreaktionsgefäße (auf Eis gekühlt) überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Um die Transformationseffizienz der so erzeugten chemisch-kompetenten Zellen zu bestimmen, wurden diese mit puC19-Plasmid-DNA (3.11) transformiert (siehe 4.10.2), die es den erfolgreich transformierten Zellen ermöglicht auf LB-Selektionsplatten mit Ampicillinzusatz zu wachsen. Zur Transformation wurden pro 50 μ l kompetenter Zellen 10 pg Plasmid-DNA in

5 µl Transformationsvolumen eingesetzt. Im Anschluss an die Transformation wurden die gewachsenen Bakterienkolonien (engl. colony forming units, cfu) gezählt und die Transformationseffizienz* mit der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Transformationseffizienz} \left[\frac{\text{cfu}}{\text{mg}} \right] = \frac{\text{cfu}}{\text{Plasmid - DNA} [\text{mg}]}$$

*Die chemisch-kompetenten Zellen sollten eine Transformationseffizienz im Bereich zwischen $1 \cdot 10^7$ cfu/µg und $1 \cdot 10^9$ cfu/µg aufweisen.

4.10.2. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurde ein Ansatz (200 µl) chemisch-kompetenter Zellen (4.10.1) auf Eis getaut. Zu diesen Zellen wurden bis zu 20 µl Plasmidlösung (entspricht 10-100 ng Plasmid-DNA) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte die Hitzeschockbehandlung der Zellen für 30 sec bei 42°C im Wasserbad. Im Anschluss wurden die Zellen unmittelbar auf Eis überführt und für 5 min gekühlt. Danach wurden 400 µl SOC-Medium (auf 37°C vorgewärmt) zu den Bakterien gegeben und diese bei 37°C schüttelnd (250 UpM) für 45 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz kurz anzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen. Die Bakterien wurden in dem verbliebenen Volumen resuspendiert, der Ansatz auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und diese üN bei 37°C inkubiert.

4.10.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im analytischen Maßstab (Miniprep)

(Sambrook und Russel, 2001)

Alkalische Lyse Lösung I (Mini 1)

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA. Bei 121°C für 20 min autoklavieren, danach 50 mM Glukose und 100 µg/ml RNase A (beides sterilfiltriert) zugeben. Bei 4°C lagern

Alkalische Lyse Lösung II (Mini 2)

200 mM NaOH (aus 10 M NaOH Stammlösung), 1% (w/v) SDS. Stets frisch hergestellt

Alkalische Lyse Lösung III (Mini 3)

3 M KAc, 11.5% (v/v) Eisessig, pH 5.2

3-5 ml LB Selektionsmedium wurden mit einem Bakterienklon angeimpft und auf dem Inkubationsschüttler (~200 UpM) bei 37°C üN kultiviert. 1.5 ml dieser üN-Kultur wurden in ein 2 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 30 Sekunden bei 14.000 UpM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand gründlich abgenommen und das Bakterienpellet durch Vortexen in 100 µl eiskalter Mini 1-Lösung vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 200 µl Mini 2-Lösung versetzt, der Ansatz durch mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes gründlich durchmischt und auf Eis gelagert. Das viskose

Bakterienlysat wurde mit 150 µl eiskalter Mini 3-Lösung versetzt und der Ansatz erneut durch mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes durchmischt. Die entstandene Suspension wurde anschließend für 3-5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 4°C und 14.000 UpM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit dem 2-3x Volumen 100% Ethanol versetzt und für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA im Ansatz wurde nun durch Zentrifugation (4°C, 14.000 UpM, 5 min) präzipitiert, der Überstand gründlich abgenommen und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA luftgetrocknet, in 20 µl Reinstwasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 2-8°C gelagert.

4.10.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im präparativen Maßstab (Midiprep)

(Genomed, Jet-Star-Plasmid-Kit)

Bis auf die folgenden Ergänzungen erfolgte die Plasmid-Präparation nach den Angaben des Herstellers:

1. In Schritt 2 wurden die Bakterien bei 4°C und 6000 UpM für 10 min pelletiert.
2. In Schritt 4 (Lyse) und 5 (Neutralisation) wurden die Ansätze solange durchmischt, bis eine homogene viskose Lösung (Schritt 4) entstand oder eine gleichmäßige Suspension (Schritt 5) erreicht wurde.
3. Nach der Zugabe von 0.7 VT Isopropanol (Schritt 9) wurden die Ansätze für 5-15 min bei RT inkubiert und erst danach zentrifugiert.
4. Die isolierte Midi-DNA wurde in 50 µl Reinstwasser gelöst.

4.11. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.11.1. Zucht und Stammhaltung

Für die Zucht und Stammhaltung der unterschiedlichen *Drosophila melanogaster*-Stämme wurden Standardmethoden verwendet (Ashburner, 1989; Ashburner, Hawley und Sullivan, 2000).

4.11.2. Kreuzungsexperimente zur Analyse genetischer Interaktionen

Bestimmte Kombinationen aus Mutationen in verschiedenen Genen eines Organismus können mitunter zur Ausprägung von Phänotypen führen, die anhand der individuellen Effekte der entsprechenden Einzelmutationen nicht hinreichend erklärt werden können. Dieses, als genetische Interaktion beschriebene, Phänomen kann dazu genutzt werden um einen funktionalen

Zusammenhang zwischen zwei Genen, die Auswirkungen von Mutationen oder sogar eine direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen aufzudecken (Mani et al., 2008).

Im Falle von *Drosophila* kann die Analyse von genetischen Interaktionen relativ unkompliziert durch das Einkreuzen einer Mutation in einen anderen genetischen Kontext erfolgen. Besonders häufig werden dabei Tiere, die heterozygot für zwei mutante Allele (doppelt-heterozygot) sind und Doppelmutanten untersucht. Darüber hinaus ist es möglich, durch das Einbringen eines mutanten Allels in den homozygoten Hintergrund einer zweiten Mutation die genetische Interaktion in Abhängigkeit der jeweiligen Gen-Dosis zu studieren.

Für die Experimente zur genetischen Interaktion wurden Fliegen aus balancierten Ausgangsstämmen mit den jeweiligen Mutationen direkt miteinander verkreuzt (Appendix, Abb. A2). Aus den Nachkommen wurden die doppelt-heterozygoten Tiere anhand des Fehlens der Balancerchromosom-assoziierten Marker isoliert. Diese Fliegen wurden daraufhin in unabhängigen Kreuzungen sowohl untereinander als auch mit Tieren der parentalen Ausgangsstämme verpaart. Die Embryonen aus diesen Kreuzungen wurden anschließend mit den entsprechenden Antikörperfärbungen analysiert. Die Zuordnung der Genotypen in den Kreuzungen erfolgte nach dem Ausschlussprinzip und anhand charakteristischer Phänotypen in der somatischen Muskulatur und der ECM. Nach Möglichkeit wurde auch die Expression von spezifischen Reportern in den verwendeten Linien genutzt. Insgesamt wurden für die Experimente jeweils zwei Allele jedes Gens verwendet und die genetische Interaktion somit in vier verschiedenen Allelkombinationen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen analysiert. Ein Vorteil der hier vorgestellten Methode ist die relativ hohe Anzahl an Nachkommen in den Kreuzungen sowie die Vermeidung von falsch-positiven Effekten durch unspezifische Veränderungen im genetischen Hintergrund. Eine quantitative Auswertung der Kreuzungen ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich.

4.11.3. Kreuzungsexperimente mit dem Gal4-UAS-System

(Brand und Perrimon, 1993)

Das Gal4-UAS-System ermöglicht die räumlich und zeitlich gerichtete Expression eines bestimmten Genprodukts *in vivo*. Das System beruht auf der Wirkung des Transkriptionsaktivators Gal4 aus der Hefe. In der Hefe bindet das Gal4-Protein an spezifische DNA-Sequenzen (sog. upstream activating sequences oder UAS-Elemente) und aktiviert so die Transkription eines, dem UAS-Element nachgeschalteten, Gens. Für die Nutzung dieses Systems in *Drosophila* werden spezielle (Gal4-)Treiber und (UAS-)Effektorstämme benötigt. Kreuzt man Tiere des Gal4-Treiberstammes mit Fliegen der UAS-Effektorlinie, wird in den F1-

Nachkommen die Expression des UAS-assoziierten Genprodukts in Abhängigkeit von der Aktivität des Gal4 vorgeschalteten Enhancers induziert.

4.11.4. Gal4-UAS induzierte RNA-Interferenz (RNAi)

Die endogene RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen Mechanismus zur posttranskriptionellen Genregulation (Fire et al., 1998; Hammond et al., 2001). Da durch das Einbringen von doppelsträngiger RNA in den Organismus die RNA-Interferenz auch gezielt ausgelöst werden kann, haben sich RNAi-Techniken mittlerweile als Standard in der Genforschung etabliert (Hannon, 2002; Perrimon et al., 2010).

In *Drosophila* ermöglicht die Kombination aus RNAi und dem Gal4-UAS-System (4.11.3) die zeit- und gewebsspezifische Stilllegung einer bestimmten Genaktivität im lebenden Organismus (Kennerdell und Carthew, 2000). Dazu werden mittlerweile spezielle UAS-Effektorstämme verwendet, in denen die UAS-assoziierte Transkriptionseinheit aus gegenläufig wiederholten Sequenzen (engl. inverted repeats) besteht, die eine doppelsträngige RNA-Haarnadelschleife ausbilden. Durch die Etablierung einer UAS-RNAi-Fliegenkollektion (Dietzl et al., 2007) und ihre stetige Erweiterung durch das *Vienna Drosophila RNAi Center* (VDRC) stehen mittlerweile RNAi-Linien für 88.2% aller *Drosophila*-Gene zur Verfügung.

4.11.5. Präparation einzelner Embryonen für die PCR-Analyse

NaCl-Triton

120 mM NaCl, 0.02% (v/v) Triton X-100 (Octoxinol 9)

PBS (10x)

1.38 M NaCl, 30 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 20 mM KH₂PO₄, pH 7.4

PTX

0.1% (v/v) Triton X-100 (Octoxinol 9) in 1x PBS

Die Eier wurden mit einem Pinsel und etwas NaCl-Triton Lösung von den Ablageflaschen gelöst und in Stahlsiebchen mit einer Maschenweite von 160 µm gesammelt. Die Embryonen wurden mit Leitungswasser gewaschen und anschließend in einem Gemisch aus Leitungswasser und Klorix (1:1) unter regelmäßiger Lupenkontrolle entchorionisiert. Die entchorionisierten Embryonen wurden mehrfach mit NaCl-Triton gespült und in ein Blockschälchen überführt. Je ein einzelner Embryo wurde mit einer Pipette in ein PCR-Mikroreaktionsgefäß überführt und nach Verwerfen des Überstands in 2 µl 1x PTX homogenisiert. Anschließend wurden 2 µl einer 100 µg/ml Proteinase K-Lösung in 1x PTX zum Ansatz gegeben und dieser für 1-2 Stunden bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Proteinase K durch 10-15 minütige Inku-

bation bei 95°C inaktiviert. Der Ansatz wurde im Anschluss als Template in einer PCR Reaktion (4.7) mit den entsprechenden Primern verwendet.

4.11.6. Fixierung von Embryonen

F-PBS

4% (v/v) Formaldehyd (aus Stammlösung 37%, p.a.) in 1x PBS

Das Absammeln und Entchorionisieren der Eier erfolgte wie unter 4.11.5 beschrieben. Anschließend wurden die Embryonen mehrfach mit NaCl-Triton gewaschen und in 1.5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Die NaCl-Triton Lösung wurde abgenommen und die Embryonen mit einer Fixierlösung aus F-PBS und Heptan im Verhältnis 1:1 überschichtet. Die Fixierung der Embryonen erfolgte unter starkem Schütteln bei RT für 20 min. Anschließend wurde zuerst die wässrige, danach die organische Phase abgenommen und die Embryonen wurden zweimal in Heptan gewaschen. Zur Devitellinisierung wurden die Embryonen in Heptan und Methanol (im Verhältnis 1:1) für 1-2 min kräftig geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand entlang der Phasengrenze vorsichtig abgenommen. Embryonen, die nicht entvitelliniert werden konnten, sammelten sich in der Heptanphase bzw. an der Phasengrenze und wurden mit dem Überstand entfernt. Die vollständig entvitellinierten Embryonen auf dem Boden des Reaktionsgefäßes wurden zweimal mit Methanol gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 2-8°C in Methanol gelagert.

4.11.7. Phalloidinfärbung an fixierten Embryonen

PTW

0.1% (v/v) Tween 20 (Polysorbat-20) in 1x PBS

Das Absammeln, Entchorionisieren und Fixieren der Embryonen erfolgte wie unter 4.11.5 und 4.11.6 beschrieben. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Embryonen zweimal mit Heptan gewaschen, anschließend mit Heptan und 80% Ethanol im Verhältnis 1:1 überschichtet und 1-2 Minuten auf einem Vortex-Schüttler bei 2850 UpM entvitelliniert. Danach wurde der Überstand entlang der Phasengrenze abgenommen. Die vollständig entvitellinierten Embryonen auf dem Boden des Reaktionsgefäßes wurden zweimal mit 100% Ethanol gespült und anschließend für 5 min in 100% Ethanol schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Embryonen auf einem Schüttler schrittweise (jeweils 5 min in 75%, 50% und 25% Ethanol in 1x PTW) rehydriert und danach zweimal für je 5 min in 1x PTW gewaschen. Danach erfolgte das Blocken der Embryonen für 1 h in 5% Ziegenserum (in 1x PTW) bei RT und unter leichter Bewegung.

Das Färben der Embryonen erfolgte schüttelnd bei RT und im Dunkeln in einer 1:200 Verdünnung einer 1 mg/ml Phalloidin-Tetramethylrhodamine-B-Isothiocyanat (TRITC, Sigma Aldrich)-Lösung in 1x PTW für 2h. Die gefärbten Embryonen wurden dreimal für jeweils 10 min in 1x PTW gewaschen, in Fluoromount-G eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.11.8. whole mount-Fluoreszenz-Antikörperfärbung an fixierten Embryonen

Fixierte und entvitellinisierte *Drosophila*-Embryonen (4.11.6) wurden stufenweise (jeweils 5 min in 75%, 50% und 25% Methanol in 1x PTW) rehydriert und danach zweimal für jeweils 10 min in 1x PTW gewaschen. Im Anschluss wurden die Embryonen üN bei 8°C in der entsprechenden Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers (3.9.1) schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Primärantikörperlösung abgenommen und die Embryonen auf einem Schüttler dreimal für je 10 min in 1x PTW gewaschen. Das Blocken der Embryonen erfolgte in 5% Ziegenserum (in 1x PTW) für eine Stunde auf dem Schüttler. Im Anschluss wurden die Embryonen im Dunkeln schüttelnd für 2 h mit 200 µl der entsprechenden Sekundärantikörperlösung (3.9.2) inkubiert, dann dreimal für jeweils 10 min in 1x PTW gewaschen, auf einem Objektträger in Fluoromount-G eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.11.9. whole mount-in situ-Hybridisierung an fixierten Embryonen

(modifiziert nach Tautz und Pfeifle, 1989)

BCIP-Stammlösung

170 mM 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) gelöst in Dimethylformamid. Lagerung bei -20°C im Dunkeln

Detektionspuffer (DP)

100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 9.5 (eingestellt mit 2 M NaOH)

Hybridisierungspuffer (HP)

50% (w/v) Formamid deionisiert, 25% (v/v) 20x SSC, 0.05% (v/v) Heparin (aus 50 mg/ml Stammlösung), 0.1% (v/v) Tween 20, pH 6.5 (eingestellt mit 10 M HCl)

NBT-Stammlösung

92 mM Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) gelöst in 70% (v/v) Dimethylformamid. Lagerung bei -20°C im Dunkeln

20x SSC

3 M NaCl, 300 mM Na₃Citrat

Die fixierten und entvitellinisierten *Drosophila*-Embryonen (4.11.6) wurden stufenweise auf einem Schüttler rehydriert und anschließend zweimal für jeweils 10 min in 1x PTW gewaschen. Danach wurden die Embryonen schüttelnd für 5 min in einem 1:1 Gemisch aus 1x PTW und HP äquilibriert, zur Prähybridisierung wurden mit 100 µl HP überschichtet und für mindestens 1 h auf einem Heizblock bei 55°C inkubiert. Währenddessen wurden 1-6 µl der 1:10 verdünnten, DIG-markierten RNA Sonde (4.8 und 4.9) in 100 µl HP aufgenommen, in einem Wasserbad bei 100°C für 5 min denaturiert und anschließend für 2-5 min auf Eis gekühlt. Die Embryonen wurden üN bei 55°C in dieser Sondenlösung inkubiert und danach dreimal für jeweils 20 min bei 55°C in HP gewaschen. Danach wurde der Ansatz bei RT auf einem Schüttler für 20 min in 1:1 HP/1x PTW äquilibriert und anschließend zweimal für je 20 min in 1x PTW gewaschen. Währenddessen wurde eine anti-DIG-AP-Antikörperlösung (1:200 in 1x PTW mit 5% Ziegen Serum) an fixierten und rehydrierten *Drosophila*-Embryonen für 1 h schüttelnd bei RT präabsorbiert. Diese Antikörperlösung wurde zu den hybridisierten Embryonen gegeben und der Ansatz üN schüttelnd bei 8°C inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschrte (je 10 min in 1x PTW unter leichtem Schütteln), wurde der Ansatz zweimal für je 10 min auf dem Schüttler in DP inkubiert und die Embryonen in ein Blockschälchen überführt. Währenddessen wurden 3.5 µl BCIP und 4.5 µl NBT separat in jeweils 500 µl DP verdünnt. Die so vorbereiteten NBT und BCIP Lösungen wurden zu den Embryonen gegeben und die Farbreaktion im Dunkeln bei RT gestartet. Der Fortschritt der Färbung wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Stereomikroskop kontrolliert und die Reaktion nach eigenem Ermessen durch mehrmaliges Waschen in 1x PTW abgestoppt. Die Embryonen wurden dann über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und auf einem Objektträger in Euparal eingebettet.

4.11.10. Signalverstärkung mit der ABC-Methode (Avidin-Biotin Complex Method)

(Vectastain Elite, ABC-Standard-Kit)

Das Prinzip der ABC-Methode beruht auf der hochaffinen Bindung zwischen dem Protein Avidin und dem Vitamin Biotin. Anstelle eines Fluorophor- oder Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers wird bei dieser Methode ein biotinylierter Antikörper eingesetzt. An den Biotinrest des Antikörpers wird ein Komplex aus Avidin und einem biotinylierten Markermolekül gebunden, welches dann entsprechend nachgewiesen werden kann. Die Bindung von zwei biotinylierten Antikörpern an den Primärantikörper und die Präsenz mehrerer Markermoleküle im Avidin-Biotin-Komplex führt dabei zu einer deutlichen Signalverstärkung (Hsu et al., 1981). Die ABC-Methode kann auch zur Detektion und Signalverstärkung in *whole mount*-Antikörperfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen an *Drosophila*-Embryonen eingesetzt wer-

den (Lawrence und Johnston, 1989). Als Markermolekül im Avidin-Biotin-Komplex wird dabei meist Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) verwendet, deren Aktivität durch die Oxidation chromogener oder Fluorophor-gekoppelter Substrate nachgewiesen werden kann.

Antikörperfärbung mit der ABC-Methode

Für den Einsatz der ABC-Methode in Antikörperfärbungen wurden die Embryonen (wie unter 4.11.8 beschrieben) mit einer Primärantikörperlösung inkubiert, in 1x PTW gewaschen und geblockt. Anschließend wurde der Ansatz schüttelnd für 2 h bei RT in einer 1:500 Verdünnung (in 1x PTW) des entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpers inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min in 1x PTW gewaschen. Währenddessen wurde aus den Lösungen A (Avidin) und B (Biotin-HRP) eine 1:100 Verdünnung in 1x PTW hergestellt (AB-Lösung) und diese für 30 min bei RT auf einem Schüttler vorinkubiert. Die Embryonen wurden dann in der AB-Lösung für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert.

***in situ*-Hybridisierung mit der ABC-Methode**

Die Embryonen wurden zunächst (wie unter 4.11.9 beschrieben) mit einer DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert und für die Antikörperinkubation vorbereitet. Währenddessen wurde eine 1:100 Verdünnung des anti-DIG Antikörpers (F^{AB} Fragment, aus Schaf) in 1x PTW an einem Ansatz rehydrierter Embryonen schüttelnd für eine Stunde bei RT präabsorbiert. Die Inkubation der Hybridisierungsansätze mit einer 1:10 Verdünnung (1x PTW, 5% Ziegen Serum) dieser präabsorbierten Antikörperlösung (entspricht einer Gesamtverdünnung des Antikörpers von ~1:1000) erfolgte schüttelnd in 1x PTW und bei 8°C. Nach drei Waschschritten für je 10 min in 1x PTW und dem Blocken (für 1 h auf einem Schüttler mit 5% Ziegen Serum in 1x PTW) bei RT erfolgte die Inkubation der Embryonen in einer 1:500 Verdünnung des biotinylierten anti Schaf-IgG (schüttelnd für 2 h und bei RT). Im Anschluss an drei Waschschritten (jeweils 10 min in 1x PTW) wurden die Embryonen in einer vorinkubierten AB-Lösung (s.o.) für 1 h unter leichter Bewegung bei RT inkubiert.

4.11.11. Histochemischer Nachweis der Peroxidaseaktivität

DAB-Lösung

25 mg/ml Diaminobenzidin (DAB) in 1x PBS

Die Inaktivierung des karzinogenen DAB an den verwendeten Verbrauchsmaterialien und in den eingesetzten Lösungen erfolgte mit einem 1:1 Gemisch aus Klorix und Leitungswasser.

H₂O₂-Lösung

0.3% H₂O₂

NiCl₂-Lösung

1 M NiCl₂

Die Embryonen wurden wie unter 4.11.10 beschrieben in der AB-Lösung inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min in 1x PTW auf einem Schüttler gewaschen. Daraufhin wurde der Ansatz in ein Blockschälchen überführt und der Überstand von den Embryonen abgenommen. Dem Ansatz wurde 1 ml frisches PTW zugesetzt und die Färbereaktion durch Zugabe von 20 µl DAB- und 20 µl H₂O₂-Lösung gestartet. Zum Erreichen eines schwarzen Farbniederschlages wurden zusätzlich 10 µl NiCl₂-Lösung zugesetzt (Adams, 1981). Der Fortschritt der Färbung wurde regelmäßig unter dem Stereomikroskop kontrolliert und die Reaktion bei ausreichender Färbung durch mehrfaches Waschen in 1x PTW gestoppt. Die Embryonen wurden dann in ein 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, dreimal für jeweils 10 min in 1x PTW gewaschen und schließlich auf einem Objektträger in Euparal eingebettet.

4.11.12. Fluoreszenzmarkierung mit dem TSA-Reagentiensatz

(Renaissance TSA Fluorescence Systems, Perkin Elmer)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TSA-Fluoreszenzmarkierung stets in Kombination mit der ABC-Methode (4.11.10) angewandt. So wurden die Embryonen im Anschluss an den Inkubationsschritt mit der AB-Lösung unter leichtem Schütteln dreimal für je 10 min in 1x PTW gewaschen. Danach wurde das 1x PTW durch eine 1:100 Verdünnung des entsprechenden Fluorophor-markierten Thyramids in „Amplification Diluent“ ersetzt und der Ansatz für 30 min bei RT im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen im Dunkeln und unter leichtem Schütteln drei- bis sechsmal für je 10 min in 1x PTW gewaschen und danach auf Objektträgern in Fluoromount-G eingebettet.

4.12. DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen) durchgeführt.

4.13. P-Element basierte Keimbahntransformation

Die Mikroinjektionen in *Drosophila*-Embryonen wurden von Ruth Hyland im Labor von Renate Renkawitz-Pohl (Phillips-Universität Marburg) durchgeführt.

4.14. Synthese von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide für die PCR- und Sequenzierreaktionen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

5. Ergebnisse

5.1. Isolierung der Allele *gürtelchen* (*gurt*) und *knödel* (*knod*) aus *3B1-038*

Um die zuvor identifizierten, viszeralen Mutationen auf dem *3B1-038*-Chromosom (Wolfstetter et al., 2008) unabhängig untersuchen zu können, mussten diese durch meiotische Rekombination voneinander getrennt werden (Appendix, Abb. A1). Dazu wurden aus insgesamt 20 Einzelkreuzungen sechs balancierte Fliegenstämme mit rekombinanten *3B1-038*-Chromosomen (im Folgenden als *3B1-038-R1*, *-R2*, *-R3*, *-R4*, *-R9* und *-R10* bezeichnet) etabliert, die übrigen 14 Linien brachten homozygot lebensfähige Nachkommen hervor. Die sechs letalen Linien wurden zunächst morphologisch in FASIII-Antikörperfärbungen untersucht. Dabei konnten in den Nachkommenschaften von *3B1-038-R3* und *3B1-038-R10* (nicht gezeigt) keine Abweichungen von der wildtypischen Mitteldarmmorphologie (Abb. 5.1 A) beobachtet werden, weshalb diese Stämme nicht weiter analysiert wurden. Homozygot-mutante Embryonen der Linien *3B1-038-R1*, *3B1-038-R2*, *3B1-038-R4* und *3B1-038-R9* zeigen dagegen charakteristische, viszerale Phänotypen (Abb. 5.1 C-F). So weisen Nachkommen der Linien *3B1-038-R1* (Abb. 5.1 C), *3B1-038-R2* (Abb. 5.1 D) und *3B1-038-R4* (Abb. 5.1 E) den viszeralen Streckungsdefekt sowie die Kopf- und Vorderdarmdefekte auf, die schon in den homozygot-mutanten Embryonen der Ausgangslinie (Abb. 5.1 B) zu beobachten waren. Demgegenüber bilden homozygot-mutante Nachkommen der Linie *3B1-038-R9* stets eine rundliche Mitteldarmkammer aus (Abb. 5.1 F).

Die Linien mit viszeralen Phänotypen wurden in Komplementationstests untereinander, gegen die Ausgangslinie *3B1-038* sowie *l(3)67BDb¹* und *Df(3L)AC1* gekreuzt (Appendix, Tab. A1). Dabei zeigte sich, dass *3B1-038-R4* zu allen verwendeten Linien allelisch ist. Da es bei dieser Linie folglich nicht zur Trennung der viszeralen Mutationen gekommen ist, wurde sie von den weiteren Analysen ausgeschlossen. *3B1-038-R1* und *3B1-038-R2* verhalten sich allelisch zueinander und zur Ausgangslinie, können aber *3B1-038-R9*, *l(3)67BDb¹* und *Df(3L)AC1*, die ihrerseits eine gemeinsame Komplementationsgruppe bilden, nicht komplementieren.

Insgesamt deuten die erhaltenen Befunde darauf hin, dass auf dem mutagenisierten Chromosom in der Ausgangslinie *3B1-038* zwei Mutationen vorhanden sind, die zur Ausprägung viszeraler Phänotypen führen. In Anlehnung an die viszerale Morphologie mutanter Embryonen wurden die entsprechenden Allele *gürtelchen* (*gurt*) und *knödel* (*knod*) genannt. *gurt* wurde zweimal in rekombinanten Stämmen (*3B1-038-R1* und *3B1-038-R2*, in der weiteren Arbeit als *gurt* bezeichnet) isoliert, von *knod* konnte mit *3B1-038-R9* eine unabhängige Linie etabliert werden.

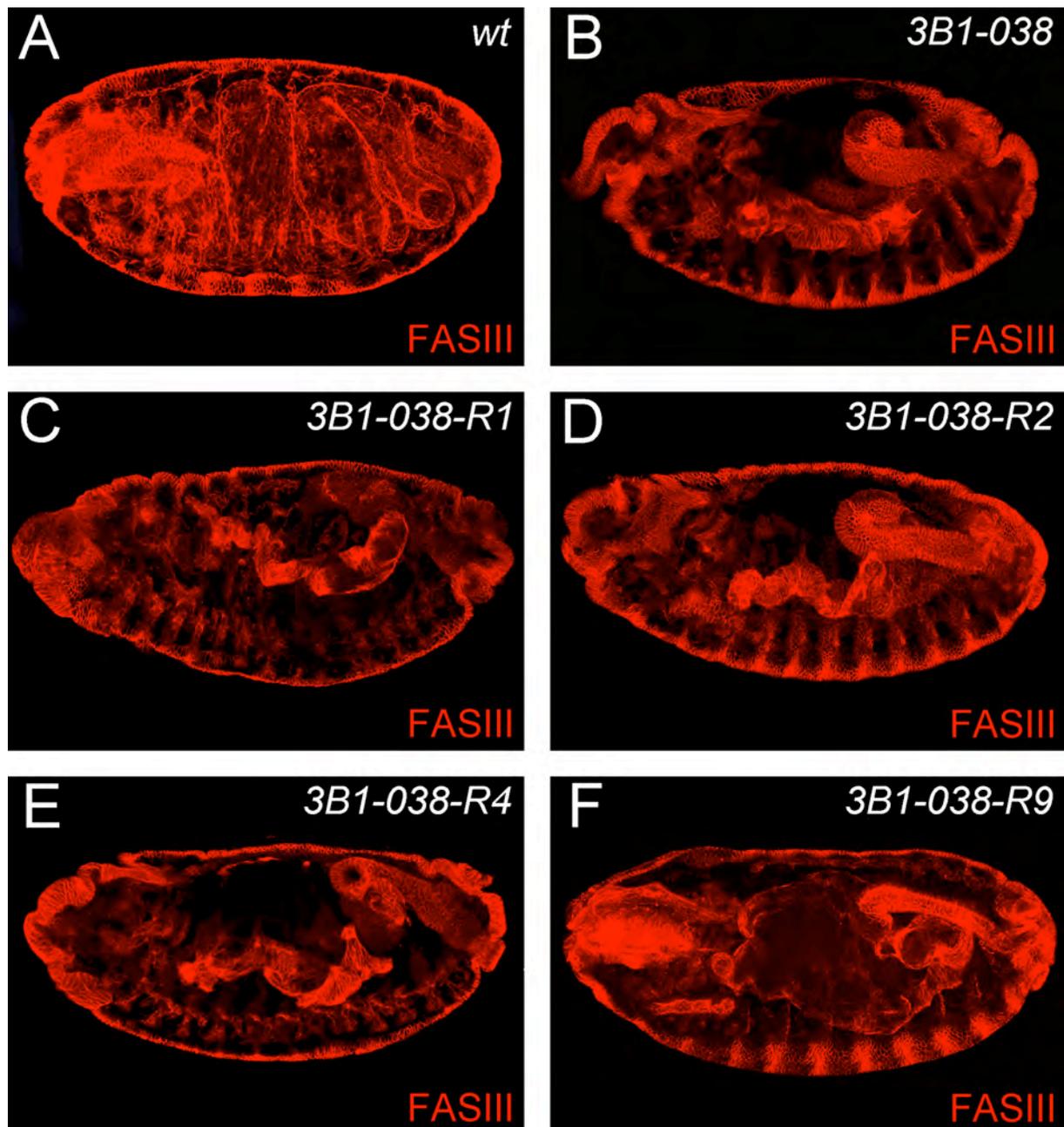


Abbildung 5.1: Analyse der viszeralen Morphologie von rekombinanten *3B1-038*-Linien. Fasciilin III (FASIII, rot)-Antikörperfärbungen von wildtypischen (*wt* in A) sowie mutanten (B-F) Embryonen im Stadium 16. (A) In der wildtypischen Situation sind vier Mitteldarmkammern ausgebildet. (B) In homozygot-mutanten Embryonen der Ausgangslinie *3B1-038* sind charakteristische viszerale Muskelbänder sowie Defekte im Kopfbereich zu beobachten. (C-E) Homozygot-mutante Nachkommen aus den rekombinanten Linien *3B1-038-R1* (C), *-R2* (D) und *-R4* (E) entsprechen in ihrem viszeralen Phänotyp der Ausgangslinie. (F) In homozygoten *3B1-038-R9*-Embryonen bildet sich eine zentrale Mitteldarmkammer, die unregelmäßig von den viszeralen Muskeln bedeckt ist. Soweit nicht anders angegeben, befindet sich anterior in den Abbildungen links und dorsal oben.

5.2. Charakterisierung von *gürtelchen* (*gurt*)

Um die chromosomale Lokalisation von *gurt* zu bestimmen, wurde die ursprüngliche Komplementationanalyse von *3B1-038* (Inauguraldissertation Stute, 2004; Diplomarbeit Wolfstetter, 2007) um Linien aus den Kollektionen des DrosDel Projects und der Exelixis Inc. ergänzt (Appendix, Tab. A2).

5.2.1. Analyse der Determination von viszeralen Muskelzelltypen in *gurt*-Embryonen

Genetische und zellbiologische Mechanismen, die den Streckungsprozesses der viszeralen Myotuben regulieren, sind bislang nicht bekannt. Allerdings belegen zahlreiche Veröffentlichungen der vergangenen Jahre, dass Störungen der frühen Muskelentwicklung auch die spätere Mitteldarmmorphologie beeinflussen können (Weiss et al., 2001; Klapper et al., 2002; Loren et al., 2003; Schröter et al., 2006).

Um die Determination der viszeralen Muskelzelltypen zu überprüfen, wurden *gurt*-mutante Embryonen sowie Wildtyp-Kontrollen mit Antikörpern gegen die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK) gefärbt (Abb. 5.2 A, B). ALK gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und wird neben dem Nervensystem auch in allen Zellen der zirkulären viszeralen Muskulatur exprimiert (Loren et al., 2001). Die spezifische Lokalisation des Proteins in der Zellmembran ermöglicht es, die morphologischen Unterschiede zwischen den viszeralen Gründerzellen (engl. Founder Cells, FCs) und den fusionskompetenten Myoblasten (engl. Fusion Competent Myoblasts, FCMs) in ALK-Antikörperfärbungen darzustellen (Stute et al., 2004). In wildtypischen Embryonen kann ALK in den Stadien 10 und 11 in allen viszeralen Zellclustern detektiert werden (Abb. 5.2 A). Jeder dieser Cluster besteht dabei aus einer Ansammlung rundlicher Muskelzellen, die von einem Bogen stabförmiger Myoblasten umrandet werden. Auch bei *gurt*-mutanten Embryonen kommt es zur Ausbildung der viszeralen Cluster, die charakteristisch wie in wildtypischen Embryonen angeordnet sind (Abb. 5.2 B).

Zum Nachweis der viszeralen FCM-Determination wurde das Expressionsmuster des WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein)-Interacting-Protein (WIP, auch als Verprolin 1 oder Solitary bezeichnet) in *gurt*-mutanten und wildtypischen Embryonen untersucht (Abb. 5.2 C, D). Vor der Myoblastenfusion wird WIP in den FCMs der somatischen und viszeralen Muskulatur exprimiert, jedoch nicht in den FCs (Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007; Eriksson et al., 2010). Gegen Ende des Stadiums 10 verbinden sich die zuvor getrennten viszeralen Cluster zu einem durchgängigen Band entlang der anterior-posterioren Achse. Die Expression von WIP kann zu diesem Zeitpunkt in den FCMs der wildtypischen viszeralen und somatischen Muskulatur nachgewiesen werden (Abb. 5.2 C). Auch *gurt*-mutante Embryonen im gleichen Entwicklungsstadium exprimieren WIP, wobei keine Unterschiede zum wildtypischen Expressionsmuster zu erkennen sind (Abb. 5.2 D).

Die Determination der viszeralen FCs wurde anhand des β -Galaktosidase-Expressionsmusters der P-Element-Insertion *P{PZ}rP298* (*rP298*, Nose et al., 1998) überprüft. *rP298* spiegelt die spezifische Expression von *dumbfounded/kin of irre* (*duf/kirre*) in allen Muskelgründerzellen wieder (Ruiz-Gomez et al., 2000). Um die Reporterexpression eindeutig einem bestimm-

ten Zelltyp zuordnen zu können, wurden die Embryonen dabei zusätzlich mit FASIII-Antikörpern gefärbt (Abb. 5.2 E, F). FASIII ist, ähnlich wie ALK, in den Membranen der viszeralen Muskelzellen lokalisiert, wobei die FASIII-Expression in den viszeralen FCs etwas stärker erscheint als in den FCMs (Klapper et al., 2002). Sowohl in den Kontrollembryonen (Abb. 5.2 E) als auch in *rP298*-positiven, homozygoten *gurt*-Embryonen (Abb. 5.2 F) kann die β -Galaktosidase-Expression innerhalb des viszeralen Mesoderms in der Reihe aus säulenförmigen FCs detektiert werden. Die Determination der beiden viszeralen Myoblastentypen erfolgt somit auch in *gurt*-mutanten Embryonen und dem beobachteten viszeralen Phänotyp sollten folglich andere Mechanismen zugrunde liegen.

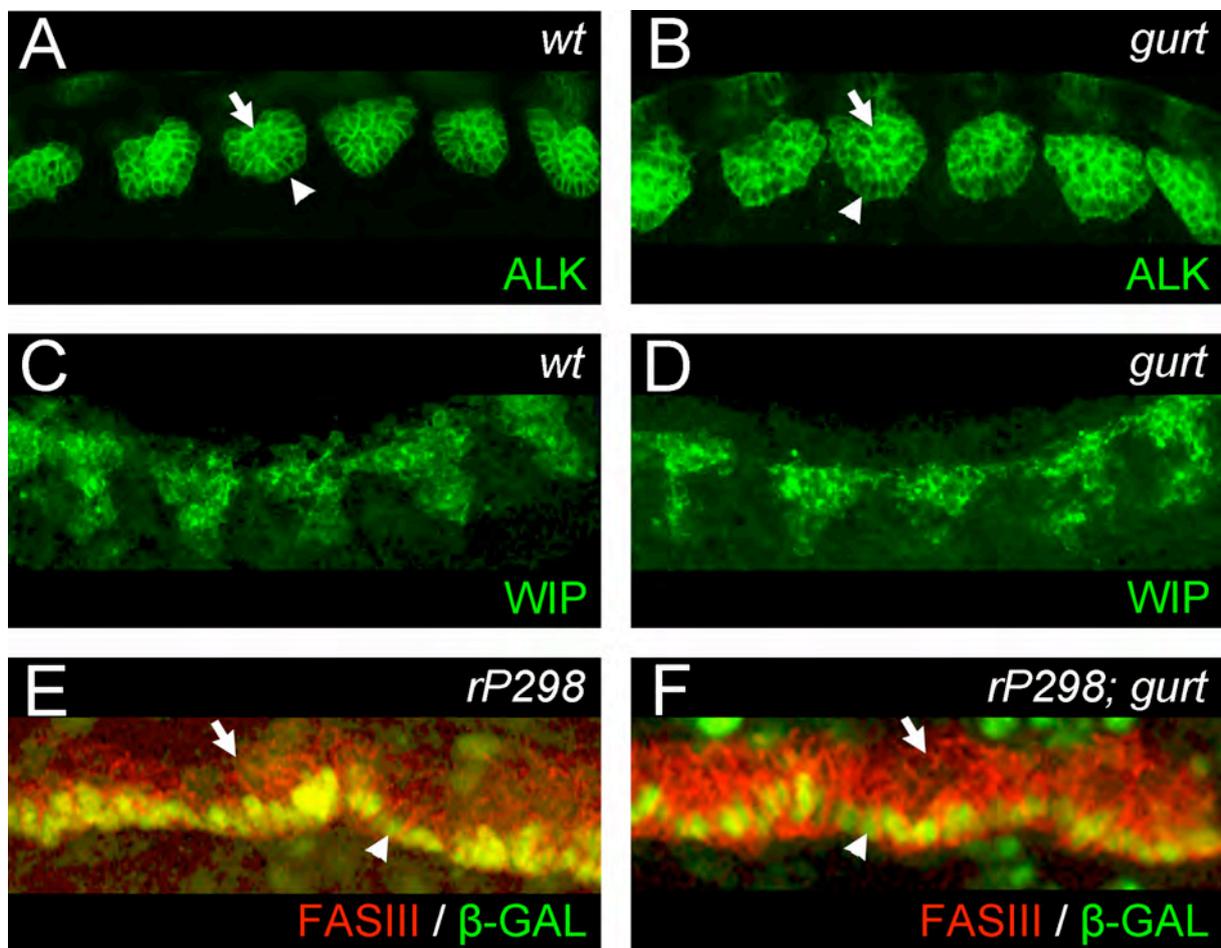


Abbildung 5.2: Antikörpernachweis der Muskelzelltermination im viszeralen Mesoderm von wildtypischen- und *gurt*-mutanten Embryonen. Embryonen im voll verlängerten Keimstreif wurden entweder mit Antikörpern gegen die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK, grün in A, B), das WASP interacting protein (WIP, grün in C, D) oder Fasciclin III (FASIII rot in E, F) gefärbt. Der Nachweis der Reportergenexpression von *rP298* erfolgte durch β -Galaktosidase-Antikörper (β -GAL, grün in E, F). (A, B) In Dorsalansichten des Stadiums 10 ist ALK membranständig in den stabförmigen, viszeralen Muskelgründerzellen (markiert durch Pfeilspitzen in A, B, E und F) sowie den globulären, fusionskompetenten Myoblasten (markiert durch Pfeile in A, B, E und F) wildtypischer (*wt*)- und *gurt*-mutanter Embryonen exprimiert. (C, D) Im Stadium 10/11 schließen sich die viszeralen Cluster zu durchgängigen Bändern im Embryo zusammen, wobei WIP in den fusionskompetenten Myoblasten von *wt* und *gurt*-mutanten Embryonen nachgewiesen werden kann. (E, F) In Dorso-lateralansichten der FASIII-markierten viszeralen Bändern von *wt* und *gurt*-mutanten Embryonen im Stadium 11 ist *rP298* in einer Reihe aus stabförmigen Muskelgründerzellen exprimiert.

5.2.2. Analyse der Entodermentwicklung in *gurt*-Mutanten

In den FASIII-Färbungen an *gurt*-Mutanten sind gegen Ende der Embryonalentwicklung neben dem viszeralen Phänotyp auch Defekte im Bereich des Vorderdarms, sowie Störungen bei der Involution des Kopfes zu beobachten (Abb. 5.1). Somit wäre es möglich, dass der beobachtete Mitteldarmphänotyp das Resultat des Einflusses benachbarter Gewebe darstellt und es sich bei *gurt* nicht um eine muskelspezifische Mutation handelt.

Deshalb wurde zunächst die Entodermentwicklung in wildtypischen sowie *gurt*-mutanten Embryonen mit Antikörpern gegen das Zelladhäsionsprotein Fasciclin II (FASII) untersucht (Abb. 5.3 A-D). Insgesamt gibt es vier Isoformen von FASII die während der Embryonalentwicklung in zahlreichen Geweben exprimiert sind (Grenningloh et al., 1991; Silies und Klämbt, 2010). Der monoklonale Antikörper 1D4 (Helt und Goodman, nicht publiziert), der die zwei Transmembran-Isoformen von FASII detektiert (Silies und Klämbt, 2010), eignet sich dabei besonders für die Darstellung der Expression in den Mitteldarmanlagen sowie den Malpighischen Gefäßen (Bodmer, 1993). Im Stadium 11/12 kann die Expression von FASII im anterioren Mitteldarmprimordium (AMP), im posterioren Mitteldarmprimordium (PMP), der Anlage der Malpighischen Gefäße (MG) sowie dem zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen werden (Abb. 5.3 A). Am Ende des Keimstreifrückzugs (St. 13/14) sind in wildtypischen Embryonen die beiden Mitteldarmanlagen im Zentrum des Embryos verschmolzen und die MG beginnen auszuwachsen (Pfeile in Abb. 5.3 C). In *gurt*-mutanten Embryonen im Stadium 11/12 (Abb. 5.3 B) ist FASII auch im ZNS und in der Anlage der MG exprimiert, kann jedoch im Bereich des AMP nicht nachgewiesen werden. Zudem ist die Zahl der FASII-positiven Zellen im Bereich des PMP stark reduziert (Abb. 5.3 B). Im Stadium 13/14 ist in *gurt*-mutanten Embryonen eine Ansammlung aus FASII-positiven Zellen in der posterioren Hälfte des Embryos zu beobachten (Abb. 5.3 D). Diese bilden eine sackförmige Struktur aus, welche auch die nicht vollständig ausgewachsenen MG (Pfeile in Abb. 5.3 D) einschließt.

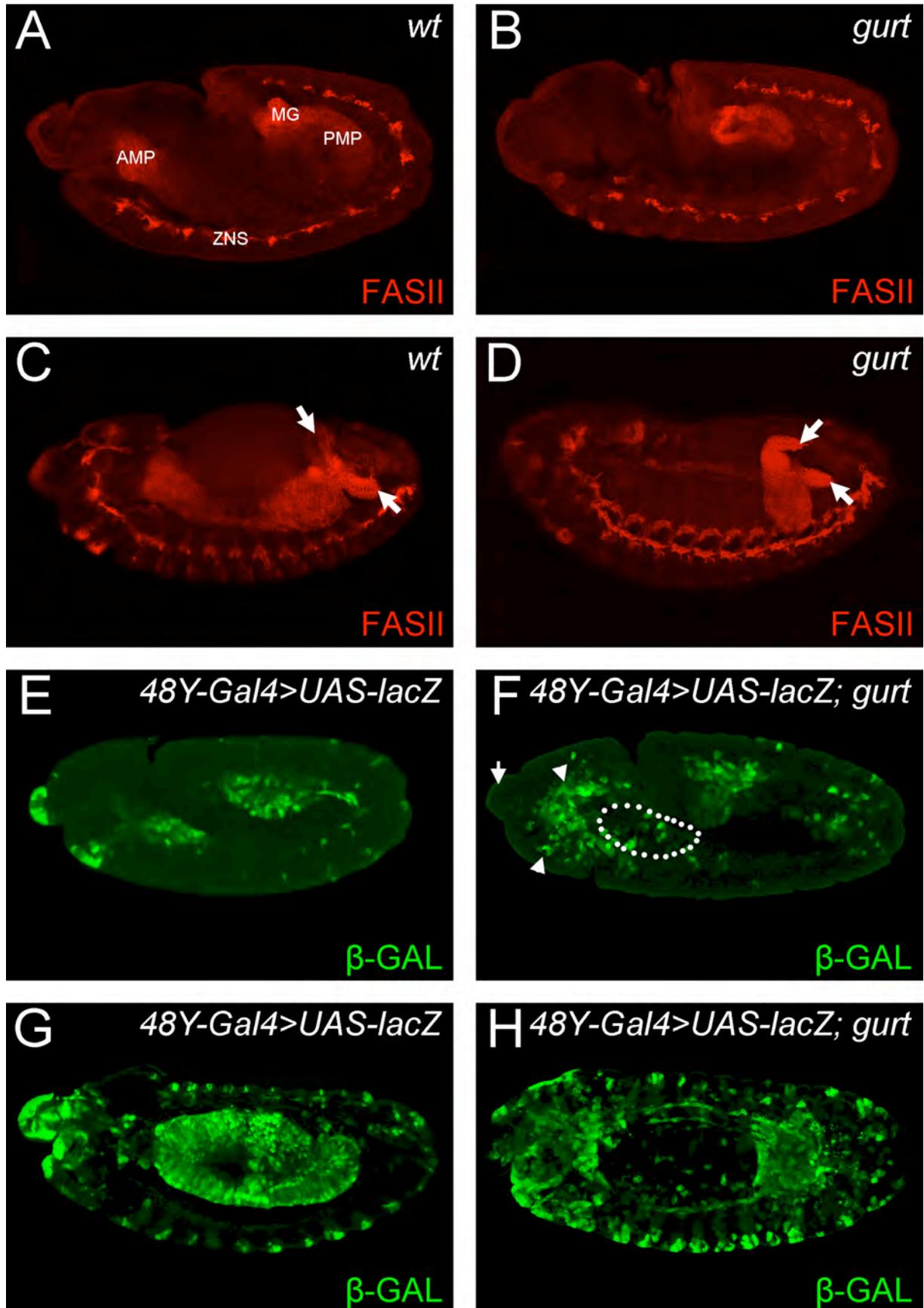


Abbildung 5.3, vorherigen Seite: Analyse der Entodermentwicklung in *gurt*-Mutanten. Wildtypische Embryonen (*wt* in A, C) sowie homozygote *gurt*-Mutanten (B, D) wurden mit Antikörpern gegen Fasciclin II (FASII, rot) gefärbt. Außerdem wurde die Expression von *48Y-Gal4>UAS-lacZ* in Kontrollen (E, G) und *gurt*-Embryonen (F, H) mit β -Galaktosidase-Antikörpern (β -GAL, grün) nachgewiesen. Die Embryonen in G und H sind in Dorso-Lateralansicht dargestellt. **(A)** Im voll verlängerten Keimstreif exprimieren *wt*-Embryonen FASII im zentralen Nervensystem (ZNS), in den Anlagen der Malpighischen Gefäße (MG) sowie im anterioren (AMP) und posterioren (PMP) Mitteldarmprimordium. **(B)** In *gurt*-Mutanten im gleichen Entwicklungsstadium fehlt die FASII-Expression in den Mitteldarmanlagen, allerdings nicht in den MG und dem ZNS. **(C)** Im Stadium 13 sind die FASII-positiven Entodermanlagen in der Mitte von *wt*-Embryonen verschmolzen und die MG (Pfeile) beginnen auszuwachsen. **(D)** In *gurt*-Mutanten im Stadium 13 fehlt das Entoderm und die MG (Pfeile) wachsen nur unvollständig aus. **(E)** Im Stadium 10/11 kann die, durch *48Y-Gal4*-induzierte, *UAS-lacZ*-Expression im Entoderm, den longitudinalen viszerale Muskeln sowie in ektodermalen Bereichen im Kopf nachgewiesen werden. **(F)** In *gurt*-Mutanten im voll verlängerten Keimstreif lagern sich *48Y-Gal4>UAS-lacZ*-positive Zellen nicht in distinkten Bereichen zusammen (Pfeile) und sind im Bereich des AMG (weiße Markierung) reduziert. **(G)** Im Stadium 13/14 markiert *48Y-Gal4>UAS-lacZ* das Entoderm, longitudinale viszerale Muskeln, den Pharynx und segmentale Bereiche in der Epidermis. **(H)** Im Bereich des Mitteldarms von *gurt*-mutanten Embryonen fehlt die entodermale Expression von *48Y-Gal4>UAS-lacZ*.

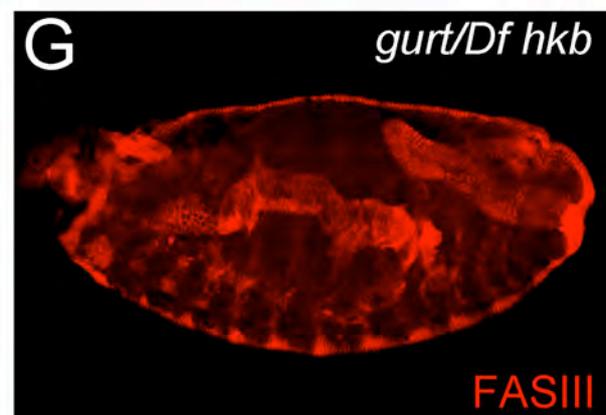
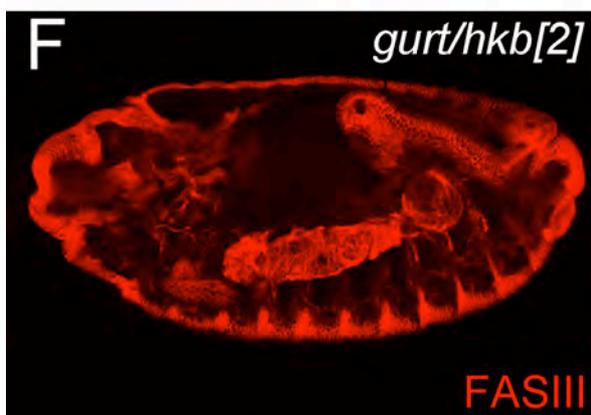
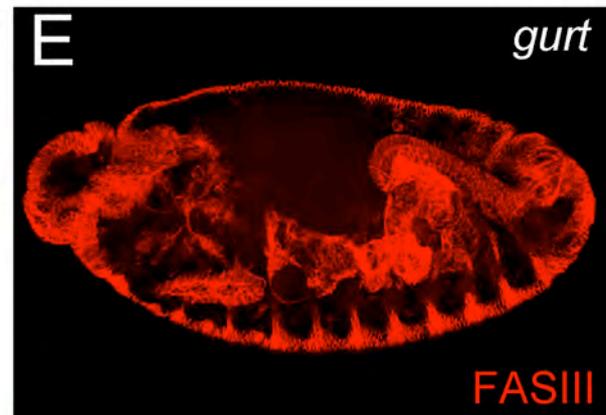
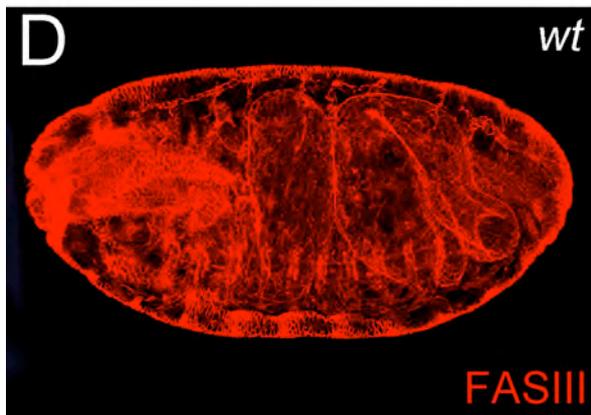
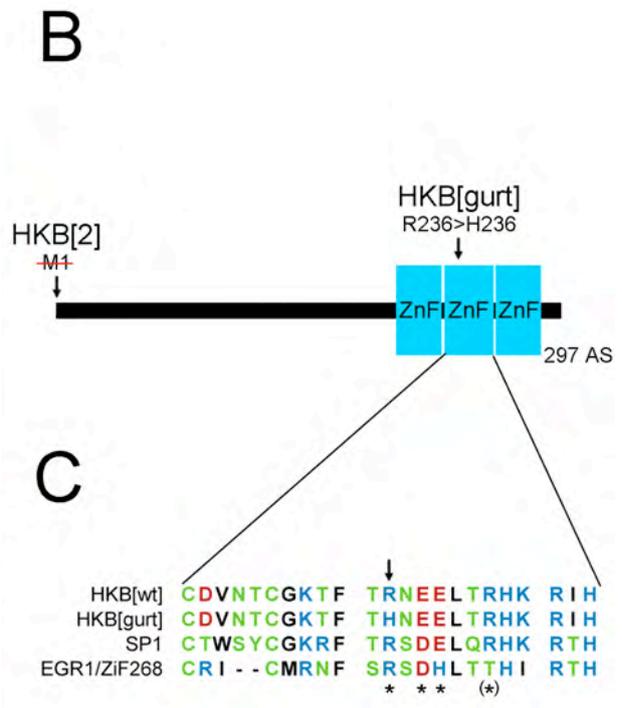
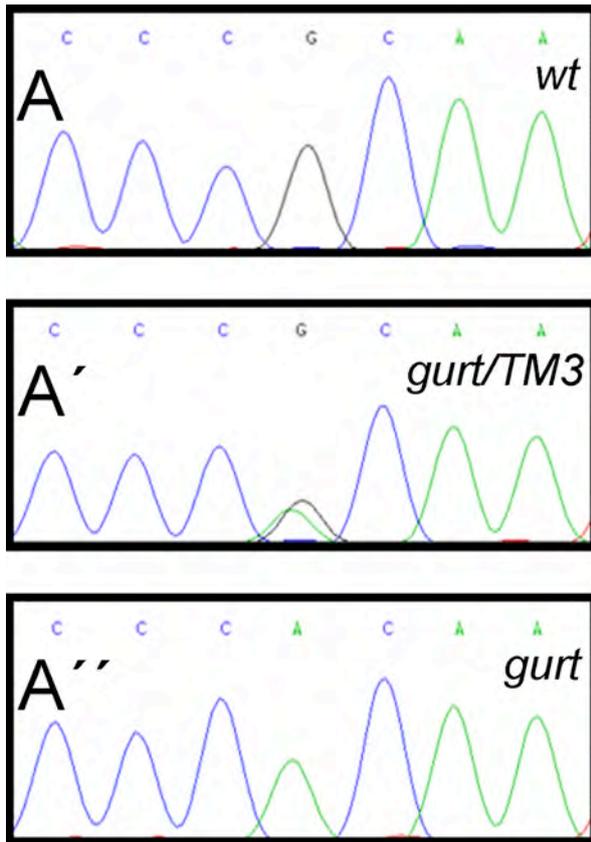
Zur weiteren Untersuchung der Entodermentwicklung wurde die Expression von *UAS-lacZ* in Kontrollen und *gurt*-mutanten Embryonen durch die P-Element Insertion *P{GawB}48Y (48Y-Gal4)* induziert, die unter der Kontrolle eines noch nicht identifizierten genomischen Enhancerelements steht (Abb. 5.3 E-H). Transheterozygote *48Y-Gal4>UAS-lacZ*-Embryonen entwickeln sich wildtypisch und exprimieren β -Galaktosidase in den Entodermzellen und den Gründerzellen der longitudinalen viszerale Muskulatur (Abb. 5.3 E). Daneben können *lacZ*-positive Zellen im Bereich des Pharynx und ab Stadium 11 auch zunehmend in segmentalen Streifen in der Epidermis nachgewiesen werden (Abb. 5.3 E, G; Martin-Bermudo et al., 1997). In *gurt*-mutanten Embryonen im Stadium 11/12 kann eine starke Reduzierung an *lacZ*-positiven Zellen in den Bereichen beobachtet werden, in denen das AMP zu vermuten wäre (Markierung in Abb. 5.3 F). Zudem fehlen die *lacZ*-positiven Zellen in der Pharynxanlage (Pfeil in Abb. 5.3 F). In der übrigen Kopfregion ist die Anzahl *lacZ*-positiver Zellen dagegen stark erhöht (Pfeilspitzen in Abb. 5.3 F). Im direkten Vergleich zur wildtypischen Situation lagern sich diese Zellen nicht zu distinkten Primordien zusammen und wirken deshalb verstreut. Im Bereich des PMP und der Anlage der longitudinalen viszerale FCs sind ebenfalls *lacZ*-positive Zellen zu erkennen. Ihre Anzahl wirkt im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.3 E) allerdings kaum verändert. Im Anschluss an den Keimstreifrückzug (Abb. 5.3 H) finden sich Ansammlungen *lacZ*-positiver Zellen in den Bereichen des Embryos, die normalerweise Ösophagus und die Cardia („Proventriculus“) beherbergen, sowie am Übergang zwischen Mittel- und Enddarm. Im Bereich des Mitteldarms kann die *lacZ*-Expression lediglich in den Zellen der longitudinalen viszerale Muskulatur nachgewiesen werden.

5.2.3. *gurt* ist ein neues Allel des *huckebein* (*hkb*)-Gens (CG9768)

Der Verlust der FASII-Expression in den Mitteldarmanlagen (Abb. 5.3 B, D) deutet auf das Fehlen differenzierter Entodermzellen in *gurt*-mutanten Embryonen hin. Die Beobachtung, dass dies mit einer erhöhten Anzahl verstreuter *48Y-Gal4>UAS-lacZ*-positiver Zellen einhergeht (Abb. 5.3 F, H), legt die Vermutung nahe, dass *gurt* an der Schicksalsentscheidung bestimmter Zelltypen beteiligt sein könnte. Daher wurden Komplementationstests zwischen *gurt* und embryonal-letalen Allelen derjenigen Gene durchgeführt, die für die frühe Entodermwicklung entscheidend sind. Hierbei zeigte sich, dass *gurt* das molekular charakterisierte Allel *huckebein*² (*hkb*², Weigel et al., 1990; De Iaco et al., 2006) nicht komplementieren kann. *gurt* und *hkb*² verhalten sich zudem allelisch zur Defizienz *Df(3R)ED5020* (*Df hkb*), die auch den *hkb* Locus bei 82A4 deletiert (John Roote und Ed Ryder, persönliche Mitteilungen an Flybase).

Um sicher zu stellen, dass es sich bei *gurt* tatsächlich um ein neues *hkb*-Allel handelt, wurde der *hkb*-Locus von heterozygoten *hkb*²/*Third Multiple 3* (*TM3*, ein Balancerchromosom)- und *gurt/TM3*-Tieren, homozygoten *gurt*-Embryonen sowie Kontrolltieren mit wildtypischer Entwicklung sequenziert. Dabei wurde die von De Iaco et al. (2006) beschriebene Basentransition an der dritten Position des *hkb*-Startcodons in *hkb*²/*TM3*-Tieren bestätigt (Abb. 5.4 B, Chromatogrammausschnitt ist nicht gezeigt). Außerdem decken die Sequenzierungen von *gurt/TM3*-Tieren sowie homozygoten *gurt*-Embryonen eine G→A Transition an Position 707 der codierenden Basensequenz auf (Abb. 5.4 A-A''). In der Aminosäuresequenz würde dies an Position 236 eine Missense-Mutation von Arginin zu Histidin herbeiführen (Abb. 5.4 B, C).

Abbildung 5.4, nachfolgende Seite: *gurt* ist ein neues *huckebein* (*hkb*)-Allel. (A-A'') Chromatogrammausschnitte der Sequenzierreaktionen mit wildtypischer (*wt*), heterozygoter *hkb*^{*gurt*}/*TM3*- und homozygoter *hkb*^{*gurt*}-DNA im Bereich der identifizierten G→A Transition. (B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des wildtypischen HKB-Proteins (HKB^{wt}) sowie der potentiellen Veränderungen in den Aminosäuresequenzen von HKB² und HKB^{*gurt*}. (C) Alignment aus den Aminosäuresequenzen des zweiten Zinkfinger-Motivs von HKB^{wt}, HKB^{*gurt*} sowie den postulierten orthologen Proteinen SP1 und EGR1/Zif268 aus Mensch und Maus. Die Position der durch die Punktmutation veränderten Aminosäure in HKB^{*gurt*} ist durch einen Pfeil hervorgehoben, an der DNA-Bindung beteiligte Aminosäuren von SP1 und EGR1/Zif268 sind durch Sterne gekennzeichnet. (D-G) Anti-Fasciclin III (FASIII, rot)-gefärbte Embryonen im Stadium 16. Anstelle des wildtypischen (*wt* in D), gekammerten Mitteldarms sind in *hkb*^{*gurt*}-Mutanten (E) sowie transheterozygoten *hkb*^{*gurt*}/*hkb*²- (F) und *hkb*^{*gurt*}/Defizienz *huckebein* (*Df hkb* in G)-Embryonen die charakteristischen viszerale Muskelbänder ausgebildet. **ZnF**=Zinkfinger-Domäne, **AS**= Aminosäure, *= DNA-bindende Aminosäure, (*) kennzeichnet eine Aminosäure die nicht in allen Zinkfingern an eine DNA-Zielsequenz bindet.



Den Analysen von Brönner et al. (1994) folgend, ist diese Substitution im zweiten von insgesamt drei postulierten C2H2-Zinkfinger Motiven in der HKB-Aminosäuresequenz lokalisiert (Abb. 5.4 B, C). Vergleicht man dieses Motiv mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen der Transkriptionsfaktoren SP1 und EGR1 (Akronyme für specificity protein 1 und early growth response protein), die eine große Ähnlichkeit zu HKB aufweisen (Brönner et al., 1994) und deren DNA-Bindeeigenschaften bekannt sind (Iuchi, 2001), stellt man fest, dass die Position des betroffenen Arginins in allen drei Proteinen konserviert ist (Abb. 5.4 C, Pfeil). Im Falle von SP1 und EGR1 ist dieses Arginin eine der Aminosäuren, die für die sequenzspezifische Bindung des Zinkfingers an die Ziel-DNA essentiell sind (Abb. 5.4 C, Sterne; Iuchi, 2001).

Um weiterhin festzustellen, ob die aufgedeckte Mutation im *huckebein*-Gen mit dem viszeralen Phänotyp in *gurt*-Mutanten korreliert, wurden diese im Vergleich zu transheterozygoten *gurt/hkb²*- und *gurt/Df hkb*-Keimen sowie wildtypischen Embryonen (*wt* in Abb. 5.4 D) in FASIII-Antikörperfärbungen morphologisch analysiert (Abb. 5.4 D-G). Der charakteristische Streckungsdefekt der viszeralen Muskulatur von *gurt*-mutanten Embryonen (Abb. 5.4 E) ist dabei auch in der transheterozygoten Situation zur *hkb*-Defizienz (Abb. 5.4 G) und zu *hkb²* erkennbar (Abb. 5.4 F). *gurt* ist demnach ein neues Allel von *hkb* und die Störungen während der viszeralen Myogenese sind höchstwahrscheinlich auf einen Funktionsverlust des HKB-Proteins zurückzuführen. *gurt* wird deshalb in der weiteren Arbeit als *huckebein^{gürtelchen}* (*hkb^{gurt}*) bezeichnet.

5.2.4. Morphologische Analyse der viszeralen Muskulatur in Mutanten von terminalen Selektorgenen

Den bisherigen Analysen zur Folge führen Mutationen im *huckebein*-Gen zur Ausprägung des charakteristischen „Gürtelchen-Phänotyps“ in der viszeralen Muskulatur (Abb. 5.4; 5.5 A, B). Interessanterweise wird *hkb* nicht im Mesoderm exprimiert und ist vor allem wegen seiner Rolle als terminales Lückengen während der Entwicklung des Entoderms bekannt (Brönner und Jäckle, 1991; Brönner et al., 1994). So fehlen in *hkb*-Mutanten die anterioren und posterioren Primordien des Mitteldarms sowie die Vorderdarmanlage (Abb. 5.3; Weigel et al., 1990; Brönner et al., 1994; Reuter und Leptin, 1994). Um zu untersuchen, ob der spezifische Verlust des entodermalen Zellschicksals einen Einfluss auf die spätere Differenzierung im benachbarten viszeralen Mesoderm hat, wurden *hkb*-Mutanten sowie starke Allele der terminalen Selektorgene *serpent* (*srp*, Reuter 1994, Rehorn et al., 1996) und *forkhead* (*fkf*, Jürgens et al., 1984; Jürgens und Weigel, 1988) morphologisch mit FASIII-Antikörperfärbungen ana-

lysiert (Abb. 5.6 A, B, D, E). Zusätzlich wurden auch Mutanten für *tailles* (*tll*) und eine Defizienz für *brachyenteron* (*Df byn*) untersucht, die Defekte während der Entwicklung des ektodermalen Hinterdarms zeigen (Abb. 5.5 C, F; Strecker et al., 1986; Pignoni et al., 1990; Kispert et al., 1994; Singer et al., 1996).

In *fkh*-Mutanten ersetzen ektopische Kopfstrukturen Vorder- und Enddarm und die prospektiven entodermalen Zellen werden bis zum Ende der Embryogenese durch Apoptose abgebaut (Weigel et al., 1989). Daher sind Vorder- und Enddarmstrukturen in *fkh*⁶-mutanten Embryonen drastisch reduziert (Abb. 5.5 D). Im Bereich des eigentlichen Mitteldarms von *fkh*⁶-Mutanten im Stadium 15/16 sind dagegen klobige viszerale Muskelbänder zu beobachten, die große Ähnlichkeit zu dem für *hkb*-Mutanten (Abb. 5.5 A, B) beschriebenen viszeralen Phänotyp aufweisen. Demgegenüber ist die Gesamtmorphologie homozygoter *srp*^{9L}-Embryonen von einem starken Keimstreifrückzugsdefekt bestimmt (Abb. 5.5 E; Reuter, 1994; Rehorn et al., 1996). Im Gegensatz zu *fkh*-Mutanten (Abb. 5.5 D), in denen die Mitteldarmprimordien aufgelöst werden, adaptieren die prospektiven Entodermanlagen in *srp*-Mutanten das Schicksal von ektodermalen Vorder- oder Enddarmstrukturen (Abb. 5.5 E, Pfeile; Reuter, 1994). Auch in *srp*^{9L}-Embryonen werden klobige viszerale Muskelbänder ausgebildet, welche die viszeralen Muskeldefekte von *hkb*- und *fkh*-Embryonen phänokopieren.

Dagegen entwickeln *tll*¹-Mutanten keine Enddarmstrukturen, bilden allerdings eine zentrale Mitteldarmkammer aus, die von einer regelmäßigen, dünnen Schicht aus viszeralem Muskelgewebe umgeben ist (Abb. 5.5 C). Auch in homozygoten *byn*-Embryonen differenzieren sich die zirkulären viszeralen Muskeln und umgeben den Mitteldarm, obwohl nur rudimentäre Enddarmanlagen vorhanden sind (Abb. 5.5 F).

Zusammenfassend kann der charakteristische „Gürtelchen-Phänotyp“ also nur in der viszeralen Muskulatur derjenigen Mutanten beobachtet werden, in denen auch die entodermalen Anlagen nicht gebildet oder erhalten werden. Der Verlust des Darmektoderms in *fkh*⁶-Mutanten oder die Transformation der Entodermanlagen in *srp*^{9L}-Embryonen hat dabei anscheinend keinen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung der zirkulären viszeralen Muskulatur. Dies wird durch die Analyse von homozygoten *tll*¹- und *byn*-Embryonen weiter bestätigt, die in Abwesenheit der posterioren, ektodermalen Darmstrukturen immer noch eine Mitteldarmkammer mit differenzierter zirkulärer viszeraler Muskulatur aufweisen.

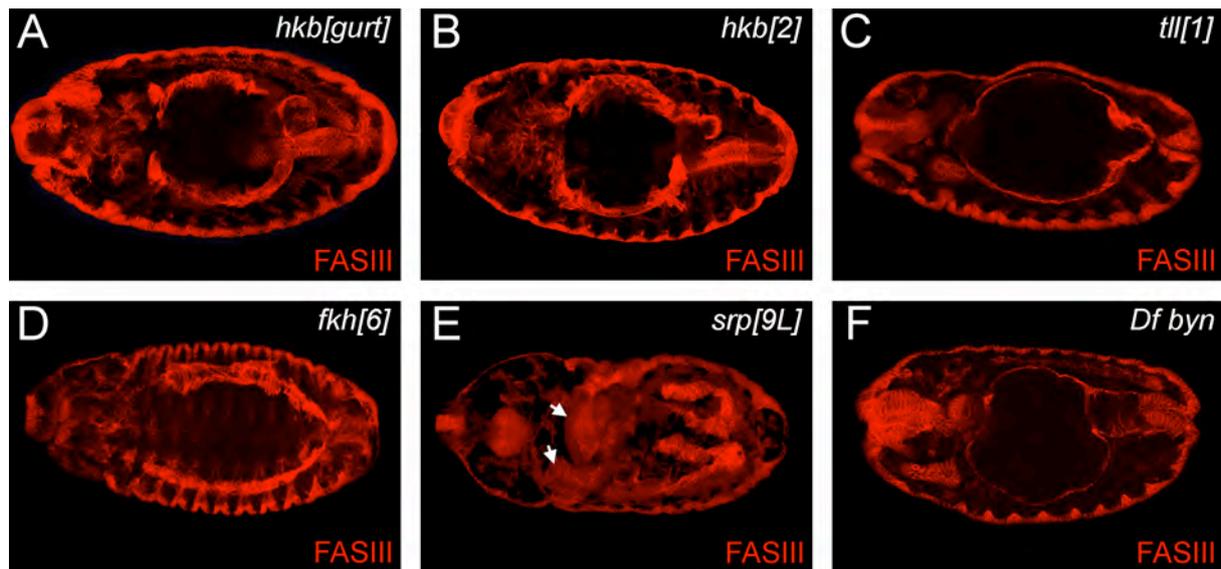


Abbildung 5.5: Morphologische Analyse der viszeralen Muskulatur in den Mutanten von terminalen Selektorgenen. Dorsalansichten von anti-Fasciclin III (FASIII, rot)-gefärbten Embryonen im Stadium 15/16. (A, B) Die viszerale Morphologie homozygoter *hkb^{gurt}*- (A) und *hkb²*- (B) Embryonen wird von starken Vorderdarmdefekten und den viszeralen Muskelbändern bestimmt. (C) *tll¹*-Mutanten fehlt der ektodermale Enddarm, jedoch ist eine zentrale Mitteldarmkammer ausgebildet, die von einer durchgehenden Schicht viszeraler Muskeln bedeckt wird. (D) Homozygote *fkh^o*-Mutanten phänotypieren die viszeralen Defekte von *hkb*-Embryonen im Bereich des Vorder- und Mitteldarms und weisen darüber hinaus starke Störungen in ihrer Enddarmentwicklung auf. (E) Die Morphologie von *srp^{9L}*-Embryonen ist durch einen Keimstreifrückzugsdefekt, die Duplikation von Enddarmstrukturen und viszeralen Muskelbändern gekennzeichnet. (F) Der Verlust von *brachyenteron (byn)* in den homozygoten Embryonen einer Defizienz (*Df byn*) führt zur starken Reduzierung des ektodermalen Enddarms und zur Bildung eines ungekammerten Mitteldarms mit einer dünnen viszeralen Muskelschicht.

5.2.5. Vergleichende Analyse der viszeralen Muskelentwicklung in *hkb*-Embryonen und *mbc^{Cl}*-Fusionsmutanten

Durch die Analyse der Muskelzell-determinierung im viszeralem Mesoderm von *hkb^{gurt}*-Embryonen (5.2.1) konnte bereits ein möglicher Einfluss des Entoderms auf diesen Prozess ausgeschlossen werden. Allerdings ist es möglich, dass die Myoblastenfusion oder die darauf folgende dorso-ventrale Streckung der viszeralen Myotuben durch das benachbarte Mitteldarmgewebe beeinflusst werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Morphologie von FASIII-markierten viszeralen Muskelbändern in *hkb^{gurt}*-Mutanten und wildtypischen (*wt*) Embryonen im Anschluss an den Fusionsprozess vergleichend untersucht (Abb. 5.6 A, B, D, E). Als weitere Kontrolle wurden homozygot-mutante *mbc^{Cl}*-Embryonen analysiert, die starke Fusionsstörungen in der somatischen und viszeralen Muskulatur, und darüber hinaus Differenzierungsdefekte im viszeralem Mesoderm zeigen (Abb. 5.6 C, F; Klapper et al., 2002; Erickson et al., 1997; San Martin et al., 2001). Während sich die viszeralen Myotuben wildtypischer Embryonen im Anschluss an den Keimstreifrückzug dorso-ventral strecken um den zukünftigen Mitteldarm zu umschließen (Abb. 5.6 A, D), ist dieser Prozess sowohl in *hkb^{gurt}*-mutanten Embryonen (Abb. 5.6 B, E) als auch in homozygoten *mbc^{Cl}*-Mutanten (Abb. 5.6 C, F) verzögert und anormal. Dabei orientieren sich die viszeralen Muskelzellen in den mutanten Em-

bryonen zunächst nicht einheitlich entlang der dorso-ventralen Achse und es kommt zur Drehungen und Verdickungen in den viszeralen Bändern (Abb. 5.6 B, C). In späteren Stadien können in den Mutanten zwar auch vereinzelt elongierte Myotuben beobachtet werden, eine wildtypische Differenzierung der viszeralen Muskulatur wird allerdings niemals erreicht. Zudem sind in der viszeralen Muskulatur von *hkb^{gurt}*- und *mbc^{Cl}*-Embryonen rundliche Muskelzellen zu erkennen, die auf einen Fusionsdefekt in der viszeralen Muskulatur hindeuten könnten (Abb. 5.6 E, F).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Expression eines *bagpipe-lacZ*-Reporters (*bap-lacZ*; Azpiazu und Frasch, 1993) in wildtypisch entwickelten *bap-lacZ*-Embryonen sowie homozygoten *bap-lacZ; hkb^{gurt}*- und *bap-lacZ; mbc^{Cl}*-Mutanten analysiert. Im Gegensatz zur transienten Expression des endogenen *bagpipe* im viszeralen Mesoderm ist der Reporter bis zum Ende der Embryonalentwicklung in der zirkulären Mitteldarmmuskulatur nachweisbar (Azpiazu und Frasch, 1993). Dies ermöglicht es, auch unfusionierte viszerale Myoblasten darzustellen, bis diese im späten Stadium 16 von Makrophagen beseitigt werden. In *bap-lacZ*-Embryonen ist die Reporterexpression im Stadium 15 auf das Netz aus viszeralen Myotuben beschränkt, das sich nun um den Mitteldarm ausbildet (Abb. 5.6 G, J). Demgegenüber finden sich vor allem im Bereich der somatischen Muskulatur von *bap-lacZ; mbc^{Cl}*-Embryonen zahlreiche *lacZ*-Markierungen (Abb. 5.6 I, L), die auf unfusionierte viszerale Myoblasten in den Mutanten zurückzuführen sind (Pfeile in L). In *bap-lacZ; hkb^{gurt}*-Embryonen können jedoch keine *lacZ*-Markierungen außerhalb der viszeralen Bänder beobachtet werden (Abb. 5.6 H). Bei genauerer Betrachtung besteht das viszerale Mesoderm von *bap-lacZ; hkb^{gurt}*-Mutanten zu diesem Zeitpunkt aus zweikernigen Myotuben (Abb. 5.6 K, Pfeile), von denen die meisten sogar eine initiale Streckung durchlaufen haben.

Um die Entwicklung der longitudinalen viszeralen Gründerzellen zu analysieren, wurden diese in *hkb^{gurt}*-Mutanten und wildtypisch entwickelten Kontrollembryonen durch einen *crocodile (croc)-lacZ*-Reporter (*P{croc-lacZ.7}*, Häcker et al., 1995) markiert. Im Stadium 10 kann *croc-lacZ* in der Anlage der longitudinalen Gründerzellen nachgewiesen werden (Abb. 5.6 M). Auch in *hkb^{gurt}*-Mutanten deutet die *croc-lacZ*-Markierung auf das Vorhandensein von determinierten longitudinalen Muskelgründerzellen hin (Abb. 5.6 N). Im Vergleich zur wildtypischen Situation ist die Anzahl *croc-lacZ*-positiver Zellen in *hkb^{gurt}*-Mutanten allerdings erhöht (Abb. 5.6 N), da ein Teil der prospektiven Entodermzellen von *hkb*-Mutanten das Entwicklungsschicksal kaudaler Mesodermzellen adaptiert (Kusch und Reuter, 1999; Ismat et al., 2010). Während der weiteren Entwicklung wandern die longitudinalen Muskelgründerzellen auf den Bändern der zirkulären viszeralen Muskulatur nach anterior, fusionieren dabei mit den

FCMs aus diesem Gewebe und adaptieren eine längliche Morphologie (Abb. 5.6 O; Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999; Klapper, 2000). Auch in *croc-lacZ; hkb^{gurt}*-Embryonen im Stadium 12/13 (Abb. 5.6 P) werden die viszerale Bänder auf ihrer gesamten Länge von den länglichen, longitudinalen Muskeln flankiert, was auf die korrekte Differenzierung dieses Gewebes hindeutet. Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass ausschließlich der finale Prozess des dorso-ventralen Auswachsens der viszerale Myotuben durch das Entoderm beeinflusst wird.

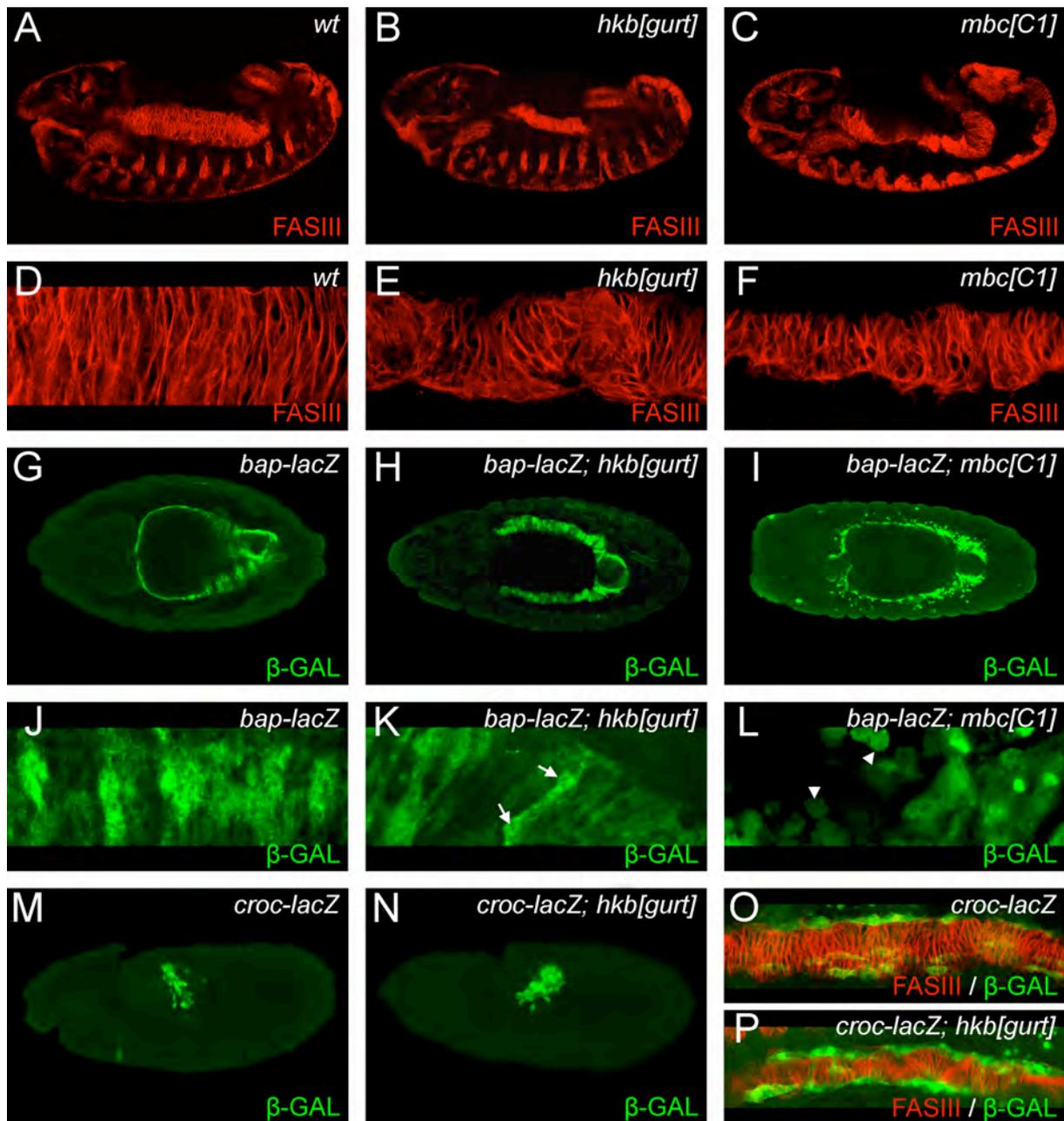


Abbildung 5.6, vorherige Seite: Vergleichende Analyse der viszeralen Muskelentwicklung in *hkb*-Embryonen und *mbc*^{Cl}-Fusionsmutanten. (A-F) Fasciilin III (FASIII)-Antikörperfärbungen des viszeralen Mesoderms von wildtypischen (*wt* in A, D) und mutanten (B, C, E, F) Embryonen im Stadium 12/13 in Lateralansicht (D-F entsprechen vergrößerten Ansichten der viszeralen Muskelbänder). In *hkb*^{gurt}- (B, E) und *mbc*^{Cl}-Mutanten (C, F) kommt es zum reduzierten Streckungswachstum und einer unregelmäßigen Anordnung von viszeralem Muskelgewebe. (G-L) Durch β -Galaktosidase (β -GAL, grün)-Antikörper nachgewiesene *bagpipe-lacZ* (*bap-lacZ*)-Reporterexpression in wildtypischen (*wt* Dorsalansicht in G, Detail einer Lateralansicht in J) sowie homozygot-mutanten (Dorsalansichten in H, I, vergrößerte Darstellungen von Lateralansichten in K, L) Embryonen im Stadium 15 lassen sich unfusionierte Myoblasten im Bereich des viszeralen Mesoderm von *bap-lacZ*; *mbc*^{Cl}-Mutanten (I, Pfeilspitzen in L) nachweisen. In *bap-lacZ*; *hkb*^{gurt}-Mutanten finden sich dagegen keine unfusionierten Myoblasten, sondern verkürzte Myotuben (H, Pfeile in K). (M-N) *croc-lacZ*-Reporterexpression (β -GAL Antikörpernachweis in grün) in Lateralansichten von *wt* (M) und *hkb*^{gurt}-Mutanten (N) im Stadium 10 markiert die Anlage der longitudinalen viszeralen Muskeln. (O, P) Ausschnitte von Lateralansichten der anti-Fasciilin III (FASIII, rot)- und anti- β -Galaktosidase (β -GAL, grün)-markierten viszeralen Muskulatur von *croc-lacZ*- und *croc-lacZ*; *hkb*^{gurt}-Embryonen im Stadium 12/13. In beiden Situationen wandern die longitudinalen Muskeln auf den zirkulären Myotuben von posterior nach anterior.

5.3. Charakterisierung von *knödel* (*knod*)

5.3.1. Zytologische Charakterisierung von *knödel* (*knod*) und *l(3)67BDb*¹

Um die Lokalisation der viszeralen Allele *knod* und *l(3)67BDb*¹ im Bereich der Defizienz *Df(3L)AC1* (67A2-67D11-13) weiter einzuschränken, wurden Allelietests mit 60 Komplementationsgruppen des entsprechenden chromosomalen Subintervalls durchgeführt (Appendix, Tab. A3). Dabei stellte sich heraus, dass *knod* und *l(3)67BDb*¹ das *LamininB2* (*LanB2*)-Allel *LanB2*^{MB04039} sowie die Defizienz *Df(3L)Exel6114* nicht komplementieren können. *LanB2*^{MB04039} wurde im Zuge einer P-Element-Mutagenese generiert (Metaxakis et al., 2005) und bislang nicht morphologisch charakterisiert. *Df(3L)Exel6114* (im Folgenden als Defizienz *LanB2* bezeichnet) deletiert das chromosomale Subintervall 67B11-67C5 und damit auch den *LamininB2*-Locus bei 67C2.

5.3.2. Nachweis von *LamininB2*-Transkripten

Der *LamininB2* (*LanB2*)-Locus besteht aus einer Transkriptionseinheit von 9061 bp im Bereich 67C2 auf dem linken Arm des dritten Chromosoms (Flybase-Datenbank, CG3322). Diese setzt sich aus 11 Exons und 10 Introns zusammen und wird zu einem einzigen Transkript von 5757 bp gespleißt. Um das Expressionsmuster des *LamininB2*-Transkripts während der Embryonalentwicklung nachzuweisen, wurden wildtypische (*wt*) Embryonen mit *LamininB2*-*antisense*-Sonden hybridisiert (Abb. 5.7 A-C). Zur Kontrolle der Sondenspezifität wurden *wt*-Embryonen mit der entsprechenden *sense*-Sonde (nicht gezeigt) und Defizienz *LanB2*-Embryonen (*Df LanB2*) mit der *LanB2*-*antisense*-Sonde hybridisiert (Abb. 5.7 D), wobei in beiden Fällen keine spezifischen Signale detektiert werden konnten.

Im Stadium 10/11 sind *LanB2*-Transkripte in der Hämocytenanlage und den prospektiven Malpighischen Gefäßen, in den Entodermprimordien sowie im Mesoderm entlang des Keim-

streifs exprimiert. Am Ende des Keimstreifrückzugs konzentriert sich die entodermale *LanB2*-Expression vor allem auf die distale Zellreihe, die in direktem Kontakt mit den viszeralen Muskeln steht (Abb. 5.7 B, Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt ist die mesodermale Expression stark reduziert und findet sich vor allem in den Hämozyten und dem Fettkörper. Am Ende der Embryonalentwicklung dominieren die *LanB2*-Transkripte im Fettkörper und den Hämozyten das Expressionsmuster (Abb. 5.7 C). Daneben können schwache Signale im Pharynx, dem Proventriculus und dem ZNS nachgewiesen werden.

5.3.3. Proteinverteilung von LamininB2

Das *LamininB2*-Transkript kodiert für ein 1639 Aminosäuren (AS) langes Protein, gegen das bereits spezifische Antikörper etabliert wurden (Kumagai et al., 1997). Um die Verteilung des LamininB2-Proteins zu untersuchen, wurden *wt*-Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie homozygot-defiziente *LanB2*-Embryonen mit LamininB2-Antikörpern (LANB2 in Abb. 5.7 E-H) markiert. Im Stadium 11 kann LANB2 in der Hämozytenanlage, den Entodermprimordien sowie im Mesoderm entlang des voll verlängerten Keimstreifs nachgewiesen werden (Abb. 5.7 E). Im Stadium 13 ist LANB2 weiterhin in den entodermalen Zellen nachweisbar, in mesodermalen Geweben reduziert sich die Expression zunehmend auf die Hämozyten und den Fettkörper sowie segmentale Gruppen von Zellen im Bereich der somatischen Muskulatur (Abb. 5.7 F). Am Ende der Embryonalentwicklung sind prominente LANB2-Signale im Fettkörper, den Hämozyten sowie den Anheftungsstellen der somatischen Muskulatur zu erkennen (Abb. 5.7 G). Zusätzlich sind auch Bereiche der viszeralen Basallamina gefärbt und die Embryonen zeigen eine schwache Färbung um die meisten inneren Körperstrukturen, was auf eine geringe Reaktivität des Antikörpers mit der LanB2-Komponente von sekretierten Laminintrimeren hinweisen könnte. Erstaunlicherweise zeigen auch LANB2-Färbungen an homozygoten Defizienz *LanB2*-Embryonen deutliche Signale in den Hämozyten, an den somatischen Muskelanheftungsstellen und im Fettkörper (Abb. 5.7 H). Im direkten Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.7 G) wirken die Embryonen glasig-durchscheinend und zeigen keinerlei LANB2-Signale um den Mitteldarm oder andere Organe. Folglich zeigt der verwendete LANB2-Antikörper eine gewisse Kreuzreaktivität mit einem anderen Protein, das nicht von einem Gen innerhalb der Defizienz kodiert wird. Die fehlenden extrazellulären Markierungen in *LanB2*-defizienten Embryonen lassen den Schluss zu, dass die Sekretion dieses Proteins entweder von LamininB2 selbst oder einem anderen Faktor innerhalb der *LanB2*-Defizienz abhängt.

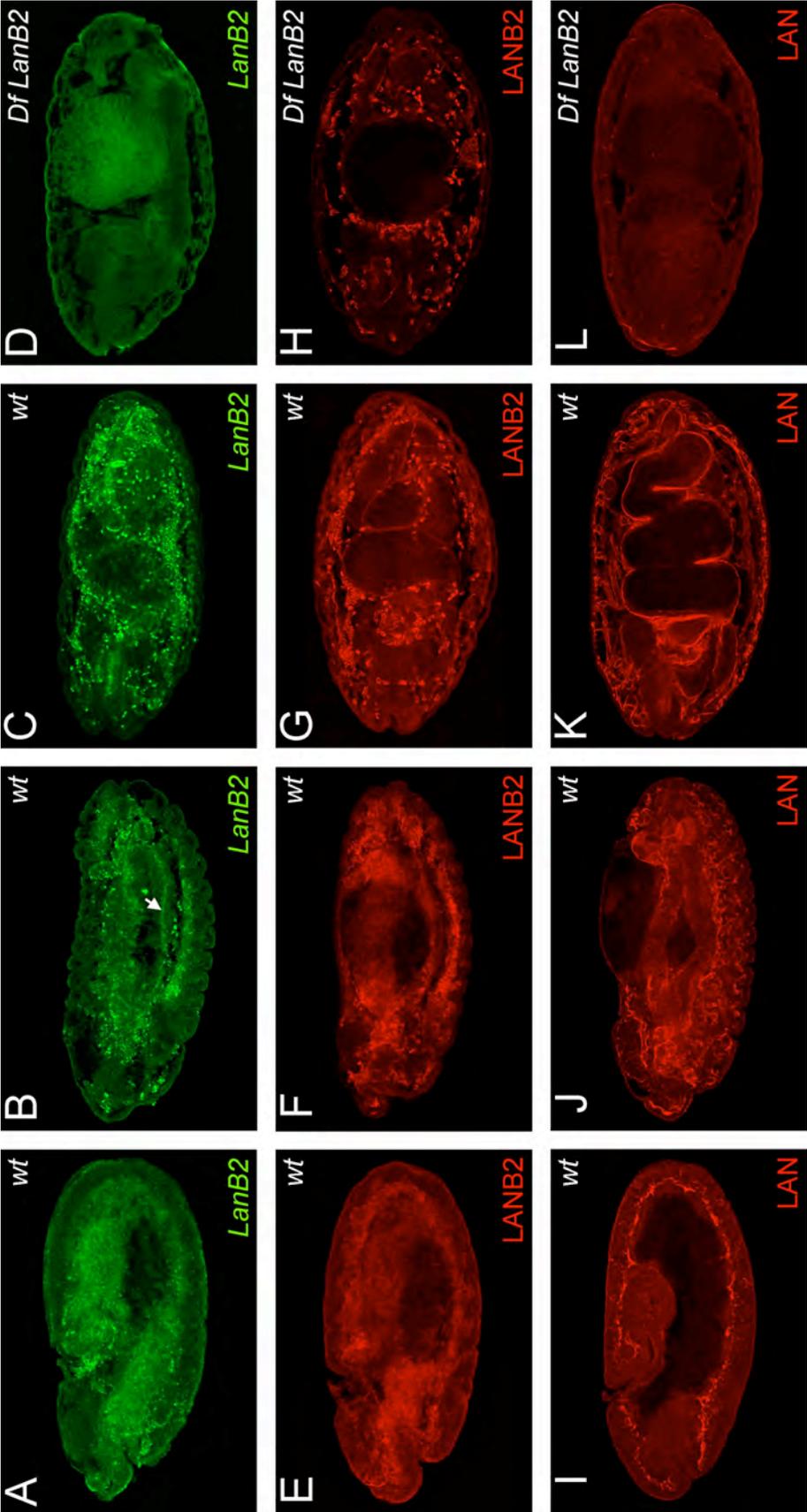


Abbildung 5.7, vorherige Seite: Nachweis der embryonalen *LamininB2*-Genexpression. (A-C) Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit *LamininB2*-antisense-Sonden (*LanB2*, grün) an wildtypischen (*wt*) Embryonen. (E-G) Detektion des *LamininB2*-Proteins in *wt*-Embryonen durch *LamininB2*-Antikörper (LANB2, rot). (I-K) Nachweis von extrazellulärem Laminin in den Basallaminae von *wt*-Embryonen mit einem spezifischen Antikörper gegen sekretierte Laminintrimere (LAN, rot). (D, H, L) Kontrolle der Sonden- bzw. Antikörperspezifität an homozygoten Embryonen einer *LamininB2*-Defizienz (*Df LanB2*). Die Embryonen sind in Dorsalansicht orientiert. (A) Im Stadium 11 werden *LanB2*-Transkripte (grün) in der Hämocytenanlage, in den Entodermprimordien sowie im Mesoderm entlang des Keimstreifs exprimiert. (B) Im Stadium 13/14 findet sich *LanB2* an der Grenze zwischen Entoderm und viszeralem Mesoderm (Pfeil), in Hämocyten und dem Fettkörper. (C) Im Stadium 16 beschränkt sich die Expression hauptsächlich auf Fettkörperzellen und die Hämocyten. (D) In Defizienz *LanB2*-Embryonen sind keine *LanB2*-Transkripte nachweisbar. (E) In *wt*-Embryonen im Stadium 11 kann die *LamininB2*-Untereinheit (LANB2, rot) in den Entodermprimordien, der Hämocytenanlage und entlang des Keimstreifs nachgewiesen werden. (F) Im Stadium 13/14 sind *LanB2*-Proteine in Entoderm (Pfeil), Fettkörper und Hämocyten exprimiert. (G) Im Stadium 16 markiert der Antikörper neben den Fettkörperzellen und Hämocyten auch Teile der Basallamina um den Darm sowie die somatischen Muskelanheftungsstellen. (H) Antikörpermarkierungen in den Hämocyten und im Fettkörper von Defizienz *LanB2*-Embryonen deuten auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers hin. (I) Sekretiertes Laminin (LAN, rot) wird in *wt*-Embryonen im Stadium 11 zunächst in der Basallamina zwischen Mesoderm und Neuroektoderm abgelagert. (J) Im Stadium 13/14 bedecken LAN-positive Basallaminae alle inneren Organe. (K) Im Stadium 16 ist LAN zusätzlich um die somatischen Muskeln und an deren epidermalen Anheftungsstellen exprimiert. (L) In *LanB2*-defizienten Embryonen (Stadium 16) können mit dem verwendeten Antikörper keine Laminintrimere nachgewiesen werden.

5.3.4. Verteilung von sekretiertem Laminin in der extrazellulären Matrix

Die vorangegangenen Analysen zeigen eine große Übereinstimmung zwischen dem Expressionsmuster von *LanB2*-Transkripten und der Verteilung des *LanB2*-Proteins. Da Laminine als sekretierte Heterotrimeren in der extrazellulären Matrix vorhanden sind, könnte sich die Verteilung von Laminintrimeren von dem Expressionsmuster der einzelnen Untereinheiten deutlich unterscheiden. Um dies zu prüfen, wurden *wt*- und *Df LanB2*-Embryonen mit Antikörpern markiert, die selektiv an sekretierte Laminintrimere binden (Kusche-Gullberg et al., 1992). Ab dem Stadium 10/11 sind im Embryo erste LAN-positive Schichten im Kopfbereich sowie zwischen Mesoderm und dem ventralen Neuroektoderm entlang des Keimstreifs nachweisbar (Abb. 5.7 I). Im Anschluss an den Keimstreifrückzug formen sich LAN-positive Basallaminae um die Malpighischen Gefäße, die Tracheen sowie die somatischen Muskeln, das Nervensystem und zahlreiche Strukturen im Kopfbereich. Außerdem sind LAN-positive Schichten dorsal und ventral der viszeralen Muskelbänder zu erkennen (Abb. 5.7 J). Am Ende der Embryonalentwicklung umgeben LAN-positive Basallaminae die inneren Organe, die somatischen Muskeln und deren epidermale Anheftungsstellen sowie die Tracheen (Abb. 5.7 K). In *LanB2*-defizienten Embryonen werden dagegen keine extrazellulären Strukturen markiert (Abb. 5.7 L).

5.3.5. *knod* und *l(3)67BDb¹* sind Allele des *LamininB2 (LanB2)*-Gens (CG3322)

Um festzustellen, ob es sich bei *knod* und *l(3)67BDb¹* tatsächlich um neue *LanB2*-Allele handelt, wurden die proteinkodierenden Bereiche im *LanB2*-Locus von wildtypischen Kontrolltieren (*wt*), heterozygoten *knod/Third Multiple 3 (TM3, ein Balancerchromosom)*- und *l(3)67BDb¹/TM3*-Tieren sowie von homozygoten *knod*- und *l(3)67BDb¹*- Embryonen sequenziert (Abb. 5.8 A-B'). Dabei konnte im Falle von *knod* (von hier an als *LamininB2^{knödel}* oder *LanB2^{knod}* bezeichnet) eine C→T Basensubstitution nachgewiesen werden, die eine Nonsense-Mutation von Arginin 948 (R948) in ein Stoppcodon zur Folge hat (Abb. 5.8 B', B'', C). Im *LanB2*-Gen von *l(3)67BDb¹/TM3*-Tieren (*l(3)67BDb¹* wird im Folgenden als *LamininB2²* oder *LanB2²* bezeichnet) wurde dagegen eine Verschiebung des Leserasters ab der Position 2598 detektiert (Abb. 5.8 A'). Die Sequenzierung des entsprechenden DNA-Abschnitts in homozygoten *LanB2²*-Embryonen enthüllt einen Austausch von Glutaminsäure 867 (E867) zu Alanin und ein Stoppcodon an Position 868 als Folge dieser Verschiebung (Abb. 5.8 A'', C). Die beiden identifizierten Translationsstopps liegen dabei vor einer C-terminalen coiled-coil-Domäne im *LanB2*-Protein (Abb. 5.8 C; Chi und Hui, 1989; Montell and Goodman, 1989), die für die spätere Trimerisierung und Sekretion der Laminin-Untereinheiten essentiell ist (Beck et al., 1990).

Darüber hinaus ist der charakteristische „knödel-Phänotyp“ in den morphologischen Analysen des viszeralen Mesoderms mit FASIII-Antikörpern nicht nur in homozygoten *LanB2²*- und *LanB2^{knod}*-Mutanten ausgeprägt (Abb. 5.8 E, F), sondern findet sich auch in Defizienz *LanB2*- (Abb. 5.8 G) sowie transheterozygoten *LanB2^{knod}/LanB2²*- (Abb. 5.8 H) und *LanB2^{knod}/Df LanB2* (Abb. 5.8 I)-Embryonen. Zwar können in den homozygoten Mutanten der einzelnen Linien Unterschiede im Einsetzten einer rudimentären Konstriktion oder der Akkumulation von viszeralem Gewebe festgestellt werden, diese leichten Schwankungen sind aber in allen untersuchten Linien gleichermaßen vorhanden. Die gleichmäßig starke Ausprägung des viszeralen Phänotyps in den untersuchten Allelen, den transheterozygoten Mutanten sowie der Defizienz lässt den Schluss zu, dass es sich bei *LanB2^{knod}* und *LanB2²* um amorphe *LamininB2*-Allele handelt.

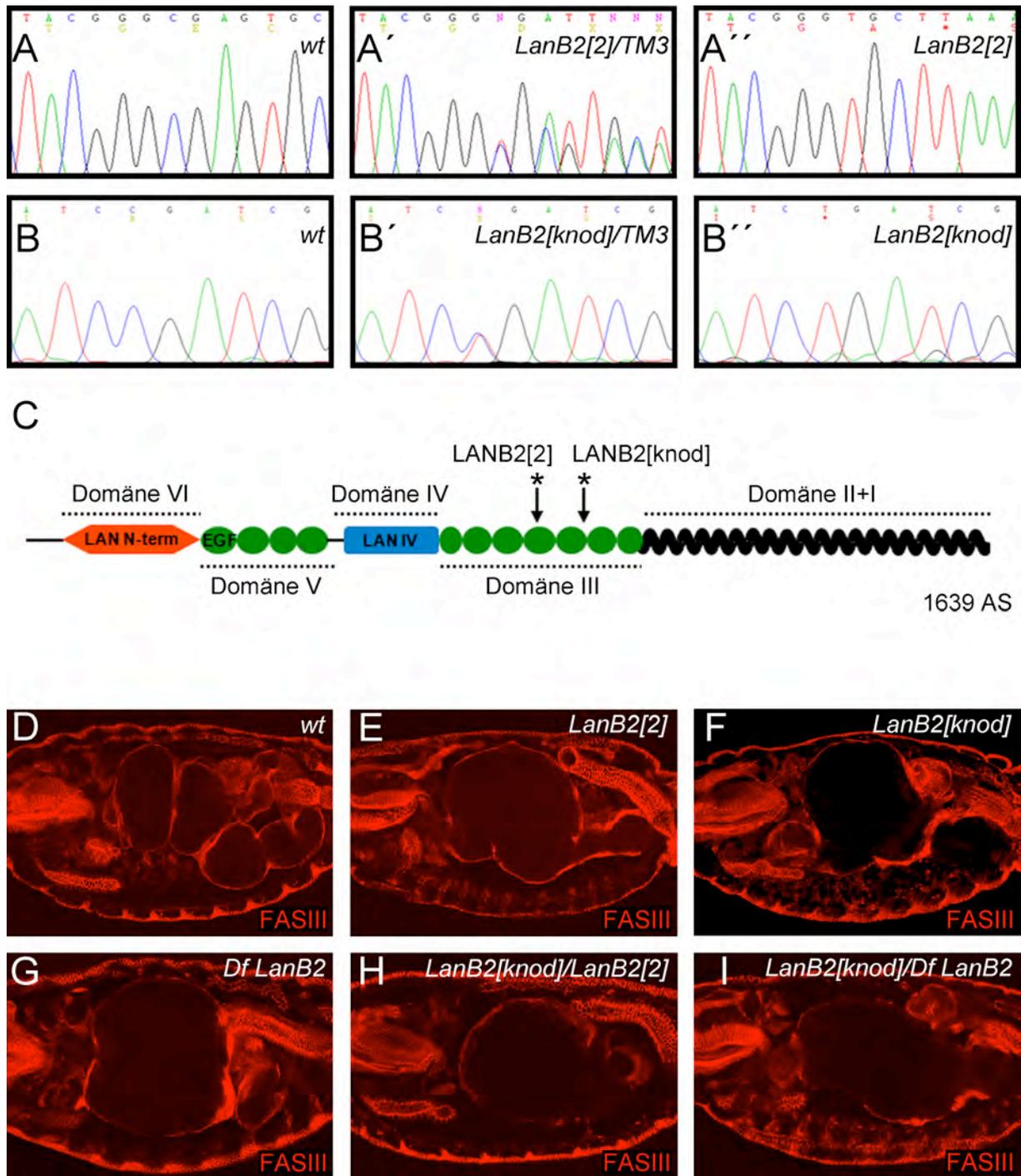


Abbildung 5.8: *knod* und *l(3)67BDb¹* sind Allele des *LamininB2* (*LanB2*)-Gens. (A-B'') Chromatogrammausschnitte der Sequenzierreaktionen mit wildtypischer (*wt* in A, B), heterozygoter (A', B') und homozygoter (A'', B'') DNA im Bereich der identifizierten Stopp-Codons (*) im *LamininB2*-Gen von *l(3)67BDb¹* (A-A'', umbenannt in *LanB2²*) und *knod* (*LanB2^{knod}* in B-B''). (C) Schematische Darstellung der LamininB2-Domänenstruktur sowie der Position von postulierten Translationsstopps (*) in *LANB2²* und *LANB2^{knod}*. (D-I) Lateralansichten von anti-Fasciclin III (FASIII, rot)-gefärbten Embryonen im Stadium 16. Im Gegensatz zum vierfach gekammerten Mitteldarm wildtypischer Embryonen (*wt* in D) bilden *LanB2²*- (E), *LanB2^{knod}*- (F) und homozygote Embryonen einer *LanB2*-Defizienz (*Df LanB2* in G) nur eine zentrale Mitteldarmkammer aus. Dieser charakteristische viszerale Phänotyp ist auch in transheterozygoten *LanB2^{knod}/LanB2²*- (H) und *LanB2^{knod}/Df LanB2* (I)-Embryonen zu beobachten.

EGF="epidermal growth factor"-ähnliches Motiv, LAN N-term=Laminin N-terminale Domäne, LAN IV=Domäne vom Laminin IV Typ, AS=Aminosäure.

5.3.6. *LanB2*^{MB04039} ist ein larval-letales *LamininB2*-Allel

Bislang stützte sich die Vermutung, dass es sich bei *LanB2*^{MB04039} um ein letales *LamininB2*-Allel handelt, vor allem auf die molekulare Analyse dieser Linie. So wurde als Ursache für die Letalität des Allels die Insertion eines modifizierten Minos-Transposons in der 3`UTR des *LamininB2* (*LanB2*)-Gens postuliert (Hugo Bellen, persönliche Mitteilung an Flybase). Die in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationstests mit zwei unabhängigen und molekular charakterisierten *LamininB2*-Allelen (siehe 5.3.1 und 5.3.5) bestätigen diese Vermutung. Weil bereits in homozygoten *LanB2*^{knod}-, *LanB2*²- sowie *LanB2*-defizienten (*Df LanB2*) Embryonen ein charakteristischer viszeraler Phänotyp festgestellt wurde (5.3.5), wurde zunächst die viszerale Entwicklung von *LanB2*^{MB04039}-Mutanten mit FASIII-Antikörpern untersucht. Bei diesen Analysen konnten in homozygoten *LanB2*^{MB04039}-Embryonen allerdings keine offensichtlichen viszeralen Defekte festgestellt werden (nicht gezeigt). Auch in der transheterozygoten Situation zu den beiden amorphen Allelen *LanB2*^{knod} und *LanB2*² führt die Mutation in *LanB2*^{MB04039} zur Ausbildung von wildtypisch entwickelten und vierfach gekammerten Mitteldärmen (Abb. 5.9 A, B). Da zudem die Morphologie der übrigen FASIII-markierten Gewebe in den Mutanten auf eine wildtypische Embryonalentwicklung hinwies, wurden zunächst Letalitätstests mit *LanB2*^{MB04039}, den beiden amorphen *LanB2*-Allelen sowie transheterozygoten *LanB2*^{MB04039}/*LanB2*^{knod}-Mutanten durchgeführt (Abb. 5.9 C). In balancierten Stämmen von *LanB2*^{knod} und *LanB2*² erreicht nur die Hälfte der Nachkommen das erste Larvenstadium (L1), was darauf hindeutet, dass neben den letalen, homozygoten Balancerembryonen auch die homozygoten Mutanten nicht schlüpfen. In der balancierten *LanB2*^{MB04039}-Linie entspricht die Anzahl der embryonal-letalen Individuen in etwa den zu erwartenden homozygoten Balancerembryonen, was vermuten lässt, dass homozygote *LanB2*^{MB04039}-Mutanten larval lebensfähig sind. Interessanterweise kommt es bei den Nachkommen der Kreuzung von *LanB2*^{MB04039}/*Third Multiple 6b* (*TM6b*, ein Balancerchromosom) und *LanB2*^{knod}/*TM6b* zu einem deutlichen Anstieg der embryonalen Letalität.

Um mögliche Auswirkungen von *LanB2*^{MB04039} auf die larvale Morphologie zu erfassen, wurden heterozygote *LanB2*^{MB04039}/*TM3*-, homozygote *LanB2*^{MB04039}- sowie transheterozygote *LanB2*^{MB04039}/*LanB2*^{knod}-L2-Larven bei 65 °C relaxiert und danach mikroskopisch analysiert. Zur Darstellung des Nervensystems in heterozygoten und mutanten Larven konnte der mit dem Minos-Transposon assoziierte *Mmus*\Pax6-EGFP-Reporter genutzt werden, der die Transgenexpression unter der Kontrolle eines künstlich erzeugten Promotors induziert (Berghammer et al., 1999; Metaxakis et al., 2005).

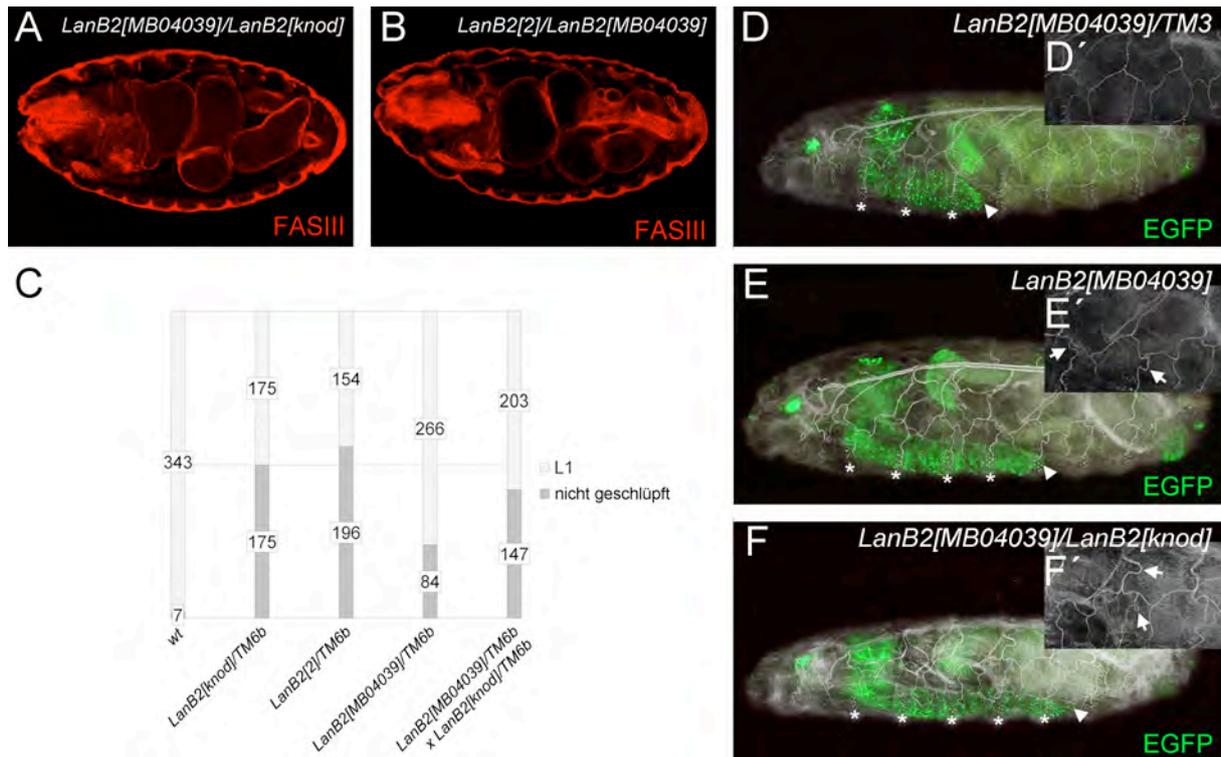


Abbildung 5.9: Morphologische Analyse des larvalen *LamininB2*-Allels *LanB2^{MB04039}*. (A, B) Fasciclin III (FASIII, rot)-Markierung des viszeralen Mesoderms von transheterozygoten *LanB2^{MB04039}/LanB2^{knod}*- und *LanB2²/LanB2^{MB04039}*-Embryonen (Stadium 16) in Dorsalansicht. (D, E, F) Lateralansichten von heterozygoten *LanB2^{MB04039}/+/-* sowie homozygot-mutanten *LanB2^{MB04039}*- und transheterozygoten *LanB2^{MB04039}/LanB2^{knod}*-L2-Larven. Dargestellt sind Negative von Durchlichtaufnahmen der larvalen Kutikula in Überlagerung mit *Mmus/Pax6-EGFP*-Fluoreszenzen. Pfeilspitzen markieren das posteriore Ende des ventralen Nervensystems, Sterne kennzeichnen die abdominalen Zähnenbänder der Kutikula an den anterioren Segmentgrenzen, die vom Nervensystem passiert werden. D', E', F' entsprechen vergrößerten Darstellungen der larvalen Kutikula aus C, D und E. (A, B) *LanB2^{MB04039}/LanB2^{knod}*- und *LanB2²/LanB2^{MB04039}*-Embryonen bilden einen vierfach gekammerten Mitteldarm aus. (C) Für die einzelnen Linien ermittelte Letalität in Diagrammform. (D, D') In *LanB2^{MB04039}/+/-*-Larven ist das ventrale Nervensystem bis in das 3. Abdominalsegment verkürzt und die Tracheenäste formen nur leichte Bögen. (E) Kondensationsdefekte im ventralen Nervensystem einer homozygoten *LanB2^{MB04039}*-Larve. (E') Die Tracheenäste von mutanten *LanB2^{MB04039}*-Larven sind durch zusätzliche Windungen und Schlaufenbildungen (Pfeile) gekennzeichnet. (F) In der transheterozygoten Situation verstärkt sich der Kondensationsdefekt des ventralen Nervensystems von *LanB2^{MB04039}*-Larven. (F') Zunehmende Trübung der Kutikula und starke Defekte in der Tracheenmorphologie (Pfeile) von transheterozygoten *LanB2^{MB04039}/LanB2^{knod}*-Larven.

Heterozygote *LanB2^{MB04039}/TM3*-Larven entwickeln sich wildtypisch und exprimieren darüber hinaus EGFP in beiden Hirnhemisphären, dem Ventralganglion, einigen Ganglien im Kopfbereich sowie im Enddarm und den Analplatten (Abb. 5.9 D). Das Ventralganglion (Abb. 5.9 D Pfeilspitze) ist zu diesem Zeitpunkt bereits stark kondensiert und erstreckt sich nur noch bis in das dritte Abdominalsegment (Abb. 5.9 D Sterne markieren die Kutikulazähnen). Im Vergleich ist die Kondensation des Nervensystems in homozygoten *LanB2^{MB04039}*-L2-Larven weit weniger fortgeschritten und das Ventralganglion (Abb. 5.9 E Pfeilspitze) der Larven erstreckt sich bis zur Grenze des fünften Abdominalsegments (Abb. 5.9 E Sterne). Neben den Defekten im Nervensystem sind in homozygoten *LanB2^{MB04039}*-Larven auch Veränderungen in der Tracheenmorphologie erkennbar (Abb. 5.9 E, E'). Im Vergleich zur wild-

typischen Situation (Abb. 5.9 D, D') weist die kutikuläre Intima der Tracheenäste zusätzliche Schlaufen und Windungen (Pfeile in E') auf. In der transheterozygoten Situation über dem amorphen Allel *LanB2^{knod}* werden die Kondensationsdefekte im Ventralganglion weiter verstärkt (Abb. 5.9 F Pfeilspitze) und auch die Schlaufenbildung in den Tracheenästen (Abb. 5.9 F' Pfeile) nimmt im Vergleich zu homozygoten *LanB2^{MB04039}*-Larven zu. Darüber hinaus ist in den transheterozygoten Larven eine Trübung der gesamten Kutikula erkennbar, was auf Störungen während der Sekretion oder dem Einbau von Kutikulabestandteilen hindeuten könnte. Zusammenfassend führt die Mutation in *LanB2^{MB04039}* zur post-embryonalen Letalität in homozygoten Mutanten. Zusätzlich kommt es in der transheterozygoten Situation zu den amorphen *LanB2*-Allelen zur Induktion von embryonaler Letalität sowie der Verstärkung von Phänotypen im Nervensystem und den Tracheen. Folglich ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei *LanB2^{MB04039}* um ein hypomorphes Allel von *LanB2* handelt.

5.3.7. Morphologische Analyse von *LanB2*-Nullmutanten

Das komplexe Expressionsmuster von *LamininB2* und die Verteilung von sekretierten Laminin Trimeren um zahlreiche embryonale Gewebe (5.3.4) deuten auf eine mögliche Funktion von *LanB2* während der Entwicklung dieser Strukturen hin. Neben dem prominenten Mitteldarmphänotyp (5.3.11) wurde vor allem die Entwicklung von mesodermalen Organen und Geweben morphologisch analysiert (Abb. 5.10 A-J). Da durch das hypomorphe *LanB2^{MB04039}*-Allel auch Kondensationsdefekte im Nervensystem und Störungen in der Tracheenmorphologie induziert werden, wurden diese Gewebe zusätzlich in den embryonal letalen *LanB2*-Mutanten untersucht (Abb. 5.10 K, L).

Die Markierung der somatischen Muskulatur in Wildtypen und *LanB2*-mutanten Embryonen im Stadium 16 erfolgte mit Antikörpern gegen β 3-Tubulin (β 3TUB, auch als β -Tubulin at 60D bezeichnet), das während der Embryogenese vor allem in Muskeln exprimiert wird (Leiss et al., 1988; Buttgerit et al., 1996). Wildtypische Embryonen bilden ein segmentales, stereotypes Muskelmuster aus vielkernigen Myotuben aus (Abb. 5.10 A, C, Für eine detaillierte Angabe zur Nomenklatur der somatischen Muskulatur siehe Appendix, Abb. A3). In *LanB2*-mutanten Embryonen wird dieses Muskelmuster an variablen Positionen von Lücken unterbrochen (5.10 B). Anstelle von differenzierten Myotuben finden sich dort entweder dünne, β 3TUB-positive Filamente (5.10 D, Stern), unfusionierte Myoblasten (5.10 D, Pfeilspitzen) oder rundliche Muskeln die nicht an den Apodemen anheften (5.10 D, Pfeile). Gegen Ende der Embryonalentwicklung kann in einigen Mutanten außerdem die Ablösung der dorsalen Muskelgruppen vom Herz beobachtet werden (nicht gezeigt). Neben diesen variablen De-

fekten ist stets die Entwicklung der schrägen ventralen Muskeln (ventral oblique-, oder VO-Muskeln; Abb. 5.10 E, Pfeile) der drei Thorax- und des ersten Abdominalsegments betroffen. In *LanB2*-mutanten Embryonen sind die VO-Muskeln stark reduziert oder werden gar nicht gebildet (Abb. 5.10 F, Pfeile).

Zur Analyse des Dorsalgefäßes wurde GFP mit einem *hand-GFP*-Reporter (*handC-GFP*; Sellin et al., 2006) in allen Herzzellen von *wt* und *LanB2*-Mutanten exprimiert. Zusätzlich wurde die extrazelluläre Matrix um das Dorsalgefäß mit Antikörpern gegen Pericardin (PRC), einem Kollagen IV-verwandten Protein, das hauptsächlich von Pericardialzellen exprimiert wird, markiert (Zaffran et al., 1995; Chartier et al., 2002). Das Dorsalgefäß von *hand-GFP*-Embryonen entwickelt sich wildtypisch und besteht im Stadium 16 aus zwei Reihen rechteckiger Cardioblasten, die das Herzlumen umschließen und ihrerseits von rundlichen Pericardialzellen umgeben sind (Abb. 5.10 G). Auf ihrer basalen Seite liegen die Cardioblasten einer PRC-positiven ECM-Schicht auf, die Pericardialzellen sind dagegen lose von einer extrazellulären Matrix umgeben, die ebenfalls PRC enthält. In *LanB2*-mutanten Embryonen löst sich ab dem Stadium 15 der Kontakt zwischen Pericardialzellen und den Cardioblasten auf, was die Dissoziation der Pericardzellen vom Dorsalgefäß zur Folge hat. Auch die Anordnung der Cardioblasten entlang des Dorsalgefäßes ist zum Ende der Embryonalentwicklung gestört (Abb. 5.10 H). An einigen Stellen akkumulieren die Zellen und es kommt zu Windungen und Brüchen des Dorsalgefäßes.

Um die Entwicklung des Fettkörpers in *wt* und *LanB2*-mutanten Embryonen zu dokumentieren, wurden diese mit Antikörpern gegen Serpent (SRP; Reuter, nicht publiziert) und Fasciclin III (FASIII) markiert. Das *serpent*-Gen von *Drosophila* kodiert für den A-box-binding factor (ABF) aus der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren und wird nach dem Keimstreifrückzug vor allem im Fettkörper und den Hämocyten exprimiert (Abel et al., 1993). Die Fasciclin III-Markierung ermöglicht die Identifizierung von *LanB2*-Mutanten anhand des Mitteldarmphänotyps. In *wt*-Embryonen bilden die segmental angelegten Primordien des Fettkörpers zunächst eine geschlossene Zellschicht, die zum Ende der Embryogenese an mehreren Stellen von anderen Organen durchstoßen wird (Abb. 5.10 I; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Auch der Fettkörper von *LanB2*-Mutanten entwickelt sich zunächst wildtypisch (nicht gezeigt), bricht aber ab dem Stadium 15/16 an mehreren Stellen auf und zerfällt schließlich in mehrere Teile (Abb. 5.10 J). Interessanterweise haften die Bruchstücke des Fettkörpers immer noch der Speicheldrüse an, obwohl auch diese in *LanB2*-Mutanten nicht korrekt ausgerichtet ist.

Zur Analyse der Tracheenentwicklung wurde der monoklonale Antikörper (Mab) 2A12 verwendet, der eine unbekannte Komponente des Tracheenlumens detektiert (Patel und Goodman publiziert von Manning und Krasnow, 1993). Im Anschluss an den Keimstreifrückzug wachsen aus den invaginierten Tracheenplakoden, tubuläre Tracheenäste aus, die sich in einem charakteristischen Muster verzweigen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Manning und Krasnow, 1993). Dabei fusionieren die dorsal anterior gerichteten Tracheenäste mit den komplementären Ästen eines Nachbarsegmentes und bilden einen durchgängigen Dorsalstamm aus (Abb. 5.10 K). Andere Verzweigungen wachsen ins Keimesinnere und formen die viszeralen Tracheenäste (Abb. 5.10 Pfeilspitzen). Im Vergleich zur *wt*-Entwicklung ist das Auswachsen der Tracheenäste in *LanB2*-mutanten Embryonen verzögert oder unterbleibt nahezu ganz, sodass Lücken im dorsalen Tracheenstamm (Abb. 5.10 L, Stern) entstehen, die bis zum Ende der Embryonalentwicklung nicht mehr geschlossen werden (nicht gezeigt). Auch das Auswachsen der viszeralen Tracheenäste ist stark gestört und einige Äste fusionieren sogar atypisch mit lateralen Verzweigungen aus den Nachbarsegmenten (Abb. 5.10 L, Pfeilspitzen).

Zur Darstellung des embryonalen Nervensystems wurde Mab22C10 verwendet, der gegen ein Epitop des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Futsch gerichtet ist und alle Neurone im peripheren sowie Teile des zentralen Nervensystems markiert (Zipurski et al., 1984; Hummel et al., 2000). Im Stadium 16 wird in balancierten *LanB2^{knod}/TM6b*-Embryonen bereits die Kondensation des ventralen Nervensystems (VNS) sichtbar (Abb. 5.11 M, der Balken markiert den Abstand zwischen dem posterioren Ende des Embryos und dem Austrittspunkt der Abdominalnerven vom VNS). Darüber hinaus ist durch die Mab22C10-Markierung einzelner Neurone im VNS dessen segmentaler Aufbau erkennbar. In *LanB2*-mutanten Embryonen beginnt die Kondensation des VNS, ist aber im Vergleich zur balancierten Situation bereits in der Anfangsphase verzögert (Abb. 5.10 N). Außerdem ist der segmentale Charakter des VNS anhand der Mab22C10-markierten Neurone in den Mutanten fast nicht mehr zu erkennen. Somit deuten die erhaltenen Befunde auf eine umfassende Rolle von *Laminin* während der Entwicklung und dem Erhalt zahlreicher embryonaler Gewebe und Organe hin.

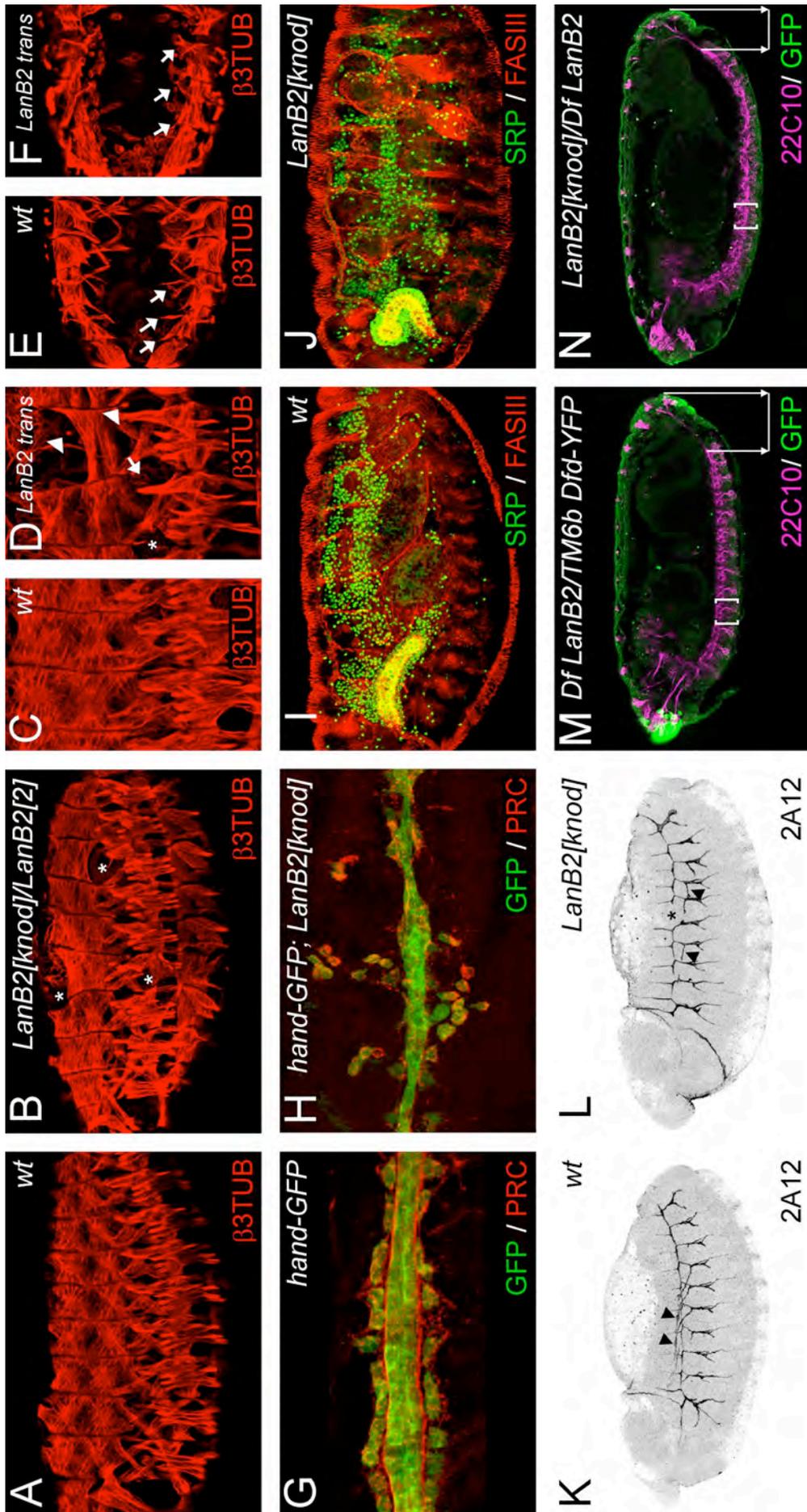


Abbildung 5.10, vorherige Seite: Analyse der embryonalen Morphologie von *LamininB2*-Nullmutanten. (A-F) Markierungen der somatischen Muskulatur von wildtypischen (*wt*, A)- und *LanB2*-mutanten Embryonen (B-F) im Stadium 15/16 mit Antikörpern gegen β 3-Tubulin (β 3TUB, rot). A-D sind in Lateralansicht dargestellt, E und F entsprechen Ventralansichten. (A) In *wt*-Embryonen ist ein charakteristisches segmentales Muskelmuster ausgebildet. (B) In der somatischen Muskulatur von *LanB2*^{knod}-Mutanten fehlen einzelne Muskeln an variablen Positionen. (C, D) Bei genauerer Betrachtung sind Anheftungsdefekte sowie eine erhöhte Anzahl unfusiozierter Myoblasten (Pfeilspitzen) in transheterozygoten *LanB2*²/*LanB2*^{knod} (*LanB2 trans* in D)-Mutanten zu erkennen. (E) Während der Normalentwicklung wachsen die indirekten Ventralmuskeln (VO-Muskeln) der Thorax- und des ersten Abdominalsegments in Richtung ihrer ventralen Anheftungsstellen aus. (F) In *LanB2*-Mutanten sind diese anterioren VO-Muskeln stark verkümmert. (G) Mit *hand-GFP* (GFP-Antikörpernachweis in grün) und anti-Pericardin (PRC, rot) markierte *wt*-Dorsalgefäße bestehen aus zwei zentralen Reihen von Cardiolblasten, die von einer PRC-positiven Schicht und rundlichen Pericardialzellen umgeben sind. (H) In *LanB2*^{knod}-Mutanten lösen sich die Pericardialzellen vom Dorsalgefäß ab und die PRC-positive Schicht fehlt. (I, J) Durch die Markierung von *wt* (I)- und *LanB2*-mutanten (J) Embryonen (Stadium 16, Lateralansichten) mit Antikörpern gegen Serpent (SRP, grün) und FASIII (rot) wurde die Fragmentation des Fettkörpers sowie die Störungen in der Speicheldrüsenmorphologie von *LanB2*^{knod}-Mutanten dargestellt. (K, L) Im Vergleich zur wildtypischen Situation (*wt*) weisen *LanB2*^{knod}-mutante Embryonen (L) die mit dem monoklonalen Antikörper 2A12 markiert wurden, Lücken im Tracheenstamm (*) sowie verkürzte oder falsch verknüpfte viszerale Tracheenäste auf (Pfeilspitzen in K und L). (M) Durch die Markierung mit dem monoklonalen Antikörper 22C10 (Magenta) ist die Kondensation des ventralen Nervensystems (in M und N hervorgehoben durch eine Linie vom posterioren Pol des Embryos bis zur hintersten Spitze des Nervensystems) in der Lateralansicht eines balancierten *Df LanB2/TM6b Dfd-YFP*-Embryos (GFP-Antikörpernachweis in grün) im Stadium 16 zu beobachten. (N) In mutanten *LanB2/Df LanB2*^{knod}-Embryonen im Stadium 16 ist diese Kondensation verzögert, zudem ist der segmentale Aufbau des Nervensystems in den Mutanten nicht mehr erkennbar.

5.3.8. Überexpression von *LanB2* in wildtypischen- und *LanB2*-mutanten Embryonen

Um zu bestätigen, dass die Phänotypen in den mutanten Embryonen tatsächlich auf den Verlust von *LamininB2* zurückzuführen sind, sollten diese durch die ektopische Expression von *UAS-LanB2* gerettet werden. Dazu wurde die *LanB2*-cDNA aus dem Klon LD15803 gerichtet in den pUAST-Vektor kloniert und transgene Fliegenlinien durch Injektion hergestellt (4.6.5. und 4.13.). Zur Analyse dieser Linien wurde zunächst die Fehlexpression von *UAS-LanB2* durch den *engrailed (en)-Gal4*-Treiber in Embryonen induziert und diese anschließend mit Antikörpern gegen die LanB2-Untereinheit (LANB2) gefärbt (Abb. 5.11 A). In *en-Gal4>UAS-LanB2*-Embryonen im voll verlängerten Keimstreif können LANB2-Antikörpermarkierungen in 14 epidermalen Steifen im Abdomen sowie in Teilen der Thorakal- und Kopfsegmente nachgewiesen werden. Im Vergleich zur nativen Expression (Abb. 5.7 E-G) wirkt die Verteilung des ektopisch exprimierten Proteins in den Epidermiszellen nicht homogen sondern akkumuliert punktförmig innerhalb der Expressionsdomänen. Um diese Anhäufungen zu lokalisieren, wurden die Epidermiszellen von *en-Gal4>UAS-LanB2*-Embryonen zusätzlich mit FASIII-Antikörpern membranständig markiert. Im Stadium 13 werden FASIII und *en-Gal4*-induziertes LanB2 in einigen Epidermiszellen koexprimiert, wobei deutlich zu erkennen ist, dass das ektopisch exprimierte Protein innerhalb der Zellen akkumuliert (Abb. 5.11 D, Pfeile).

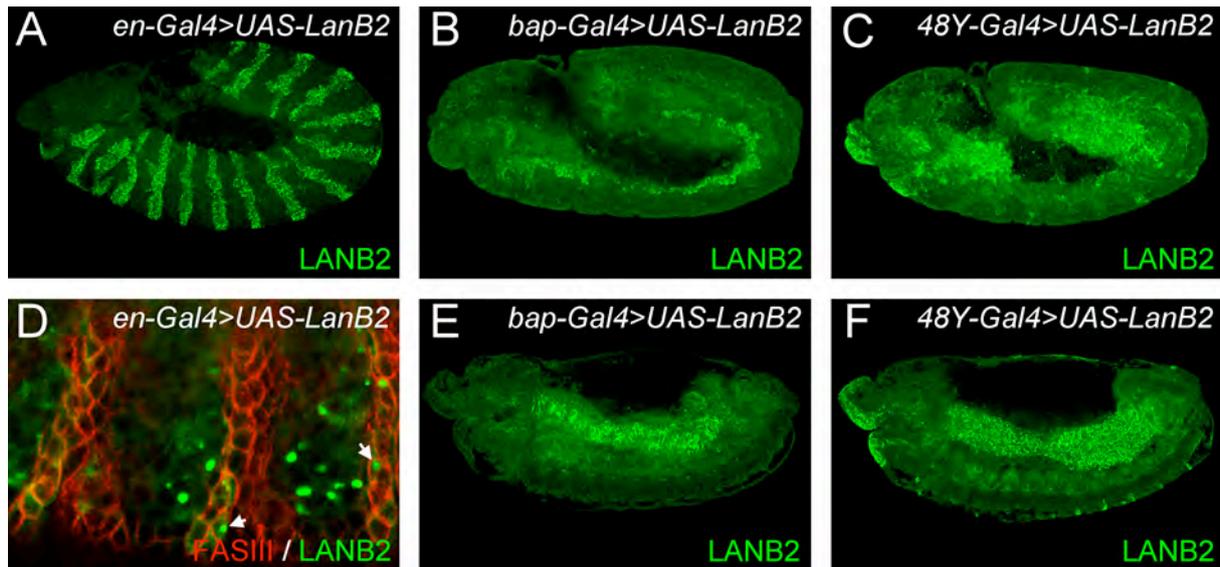


Abbildung 5.11: Ektopische Expression von LamininB2 mit dem Gal4/UAS-System. Die gewebsspezifische Expression von *UAS-LanB2* wurde durch *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*, A, D), *bagpipe-Gal4* (*bap-Gal4*, B, E) und *48Y-Gal4* (C, F) induziert und an Embryonen der Stadien 11 (A-C) und 13 (D-F) mit Antikörpern gegen das LamininB2-Protein (LANB2, grün) nachgewiesen. (A) *UAS-LanB2* wird im Stadium 11 durch *en-Gal4* in einem charakteristischen epidermalen Streifenmuster entlang der antero-posterioren Achse exprimiert. (B) Spezifische Expression von *UAS-LanB2* im viszeralem Mesoderm durch den *bagpipe-Gal4* (*bap-Gal4*)-Treiber. (C) *48Y-Gal4* induziert die Expression von *UAS-LanB2* in den Entodermprimordien, den longitudinalen viszeralem Muskeln, verschiedenen Geweben in der Kopfregion und einigen Epidermiszellen. (D) In Doppelfärbungen mit anti-Fasciclin III (FASIII, rot) und LANB2 (grün) können intrazelluläre Einschlüsse des LanB2-Proteins in der Epidermis von *en-Gal4>UAS-LanB2*-Embryonen dargestellt werden. (E, F) Auch in *bap-Gal4>UAS-LanB2*- (E) und *48Y-Gal4>UAS-LanB2* (F)-Embryonen kommt es im weiteren Verlauf der Entwicklung zur intrazellulären Akkumulation von LanB2.

Um zu überprüfen, ob es auch in anderen Geweben zur Anhäufung des Proteins kommt, wurde die Expression von *UAS-LanB2* zusätzlich mit *bagpipe-Gal4* und *48Y-Gal4* induziert. Erwartungsgemäß kann das überexprimierte Protein mit dem LANB2-Antikörper in den entsprechenden viszeralem Geweben nachgewiesen werden (Abb. 5.11 B, C). Gegen Ende des Keimstreifrückzugs kommt es aber auch in diesen Geweben zur Anhäufung des Proteins (Abb. 5.11 E, F) und es bleibt fraglich, ob tatsächlich eine Sekretion in die extrazelluläre Matrix erfolgt. Da die begrenzte Expression von anderen, nativen Laminin Untereinheiten limitierende Faktoren für die erfolgreiche Sekretion des LanB2-Proteins in der wildtypischen Situation darstellen könnten, wurde *UAS-LanB2* auch in homozygoten, *LamininB2*-mutanten Embryonen exprimiert. Durch die Verwendung von *bagpipe-Gal4* und *48Y-Gal4* als viszerale Treiberlinien ließ sich allerdings keine Veränderung des Mitteldarmphänotyps von *LanB2*-mutanten Embryonen herbeiführen (nicht gezeigt).

5.3.9. RNAi-induzierter „knock-down“ der *LamininB2*-Genexpression

Die Phänokopie der Mitteldarmdefekte von *LanB2*-mutanten Embryonen durch RNA-Interferenz (RNAi) stellt eine weitere Möglichkeit dar, den beobachteten Phänotyp in Zusammenhang mit den aufgedeckten Mutationen im *LanB2*-Gen zu bringen. Um die *LamininB2*-Genexpression gezielt durch RNAi zu hemmen, standen insgesamt drei VDRC-Linien zur Verfügung. Die Linien *v42559* und *v42560* entsprechen dabei unterschiedlichen Insertionen eines *UAS-LanB2RNAi*-Konstrukts, die Linie *v104013* repräsentiert ein unabhängiges Konstrukt aus einer anderen Bank des VDRC. Da die kurze Entwicklungszeit von *Drosophila*-Embryonen den erfolgreichen, RNAi-induzierten „knock-down“ von Genprodukten während der Embryogenese beeinträchtigt, wurden die verschiedenen Konstrukte mit dem ubiquitär und bereits maternal exprimierenden *daughterless (da)-Gal4*-Treiber (*P{GAL4-da.G32}UHI*, Wodarz et al., 1995) bei 29°C getestet. Dabei wurde eine stark erhöhte Anzahl an unbefruchteten Eiern in den Ablagen festgestellt. Die Kontrollexperimente mit *UAS-LanB2RNAi*- (siehe unten) und *da-Gal4*-Ablagen (nicht gezeigt) deuten darauf hin, dass dies auf die Verwendung des *da-Gal4*-Treibers bei 29°C zurückzuführen ist, und keinen spezifischen Effekt der *LanB2RNAi* darstellt. Zur weiteren Analyse wurden die entwickelten Embryonen sowie bei 29°C inkubierte *UAS-LanB2RNAi*-Keime mit Antikörpern gegen sekretiertes Laminin (LAN) und β 3-Tubulin (β 3TUB) gefärbt, um die Effizienz des „RNAi-knock-downs“ sowie mögliche Effekte auf die viszerale und somatische Muskelmorphologie zu dokumentieren (Abb. 5.12). *UAS-LanB2RNAi*-Embryonen aus allen drei Linien entwickeln sich ohne offensichtliche Störungen und zeigen einen wildtypisch gekammerten Darm, ein unauffälliges somatisches Muskelmuster sowie eine normal verteilte ECM (Abb. 5.12 A-C). Die Embryonen aus den *da-Gal4 > UASLanB2RNAi*-Ablagen weisen dagegen charakteristische Phänotypen in der Muskulatur sowie Veränderungen in der LAN-Expression auf (Abb. 5.12 D-F). Unter Verwendung der *v104013*-RNAi-Linie waren die beobachteten Effekte im direkten Vergleich etwas schwächer und zudem unregelmäßig ausgeprägt, weshalb diese Linie nicht weiter analysiert wurde.

Die Hälfte der analysierten Embryonen aus den Kreuzungen von *da-Gal4* mit *v42559* oder *v42560* zeigt ab dem späten Stadium 15 die charakteristischen Muskelphänotypen und Mitteldarmdefekte von *LanB2*-Mutanten (Abb. 5.12 D und F, die Sterne markieren Lücken in der somatischen Muskulatur). Zudem ist eine deutliche Reduzierung in der LAN-Expression im Bereich der Basallaminae auszumachen (Abb. 5.12 E). LAN-Signale finden sich nun hauptsächlich im Bereich des Fettkörpers, den somatischen Muskelanheftungsstellen und um die Hämocyten. Vereinzelt finden sich LAN-positive Fragmente einer rudimentären Basallamina,

die wahrscheinlich zum Ende der Embryogenese von den Hämocyten sekretiert wird (Abb. 5.12 D). In einem Viertel der Embryonen aus den entsprechenden Ablagen kann eine abgeschwächte Form der beschriebenen Defekte im LAN-Expressionsmuster beobachtet werden. Diese Embryonen wiesen dabei keine erkennbaren Muskel- oder Mitteldarmphänotypen auf. Die übrigen Keime in den Ablagen entwickeln sich ohne erkennbare Abweichungen von den Kontrollembryonen.

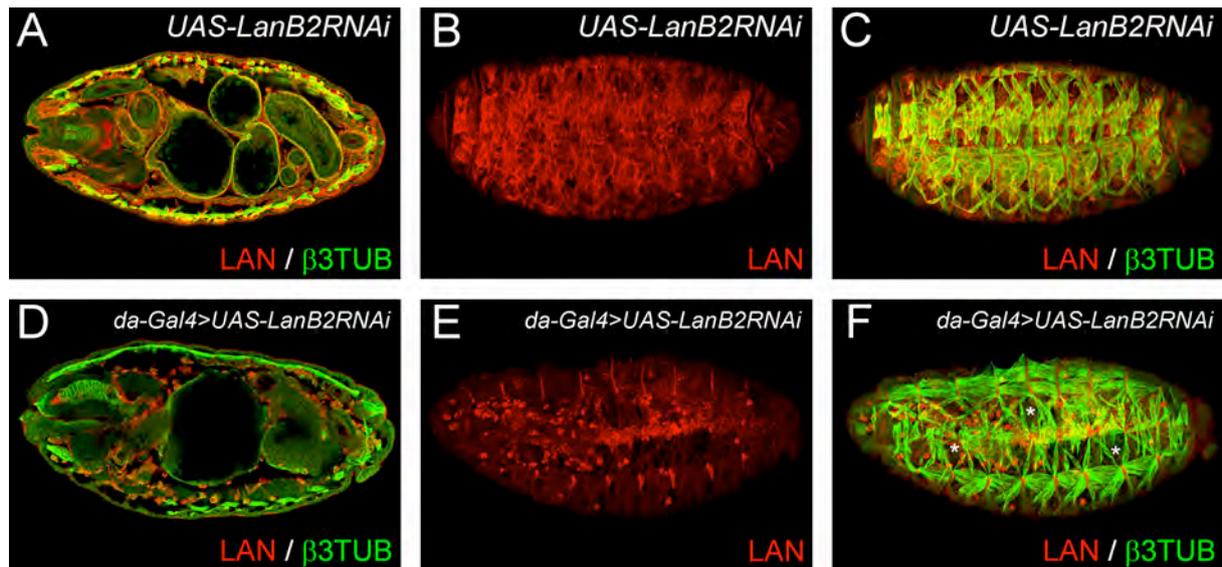


Abbildung 5.12: LamininB2-RNA-Interferenz (*LanB2*RNAi) an wildtypischen Embryonen. Die viszerale und somatische Muskulatur von *UAS-LanB2*RNAi-Kontrollembryonen (A-C) und *daughterless-Gal4* (*da-Gal4*)>*UAS-LanB2*RNAi-Embryonen (D-F) wurde im Stadium 16 mit β 3-Tubulin (β 3TUB, grün) markiert. Zur Überprüfung der RNAi-Effizienz wurde in den Embryonen zusätzlich die extrazelluläre Ablagerung von Laminintrimern mit Antikörpern gegen sekretiertes Laminin (LAN, rot) nachgewiesen. (A-C) *UAS-LanB2*RNAi-Embryonen entwickeln sich wildtypisch und zeigen keine Veränderung in ihrem Laminin Expressionsmuster. (D-F) Die Induktion von *UAS-LanB2*RNAi durch *da-Gal4* führt zu den, für *LanB2*-Mutanten charakteristischen, viszeralen und somatischen (Sterne in F) Defekten sowie zu einer deutlichen Reduzierung von sekretiertem Laminin. Die Embryonen in A und D sind in Dorsalansicht, die Embryonen in B, C, E und F in Lateralansicht dargestellt.

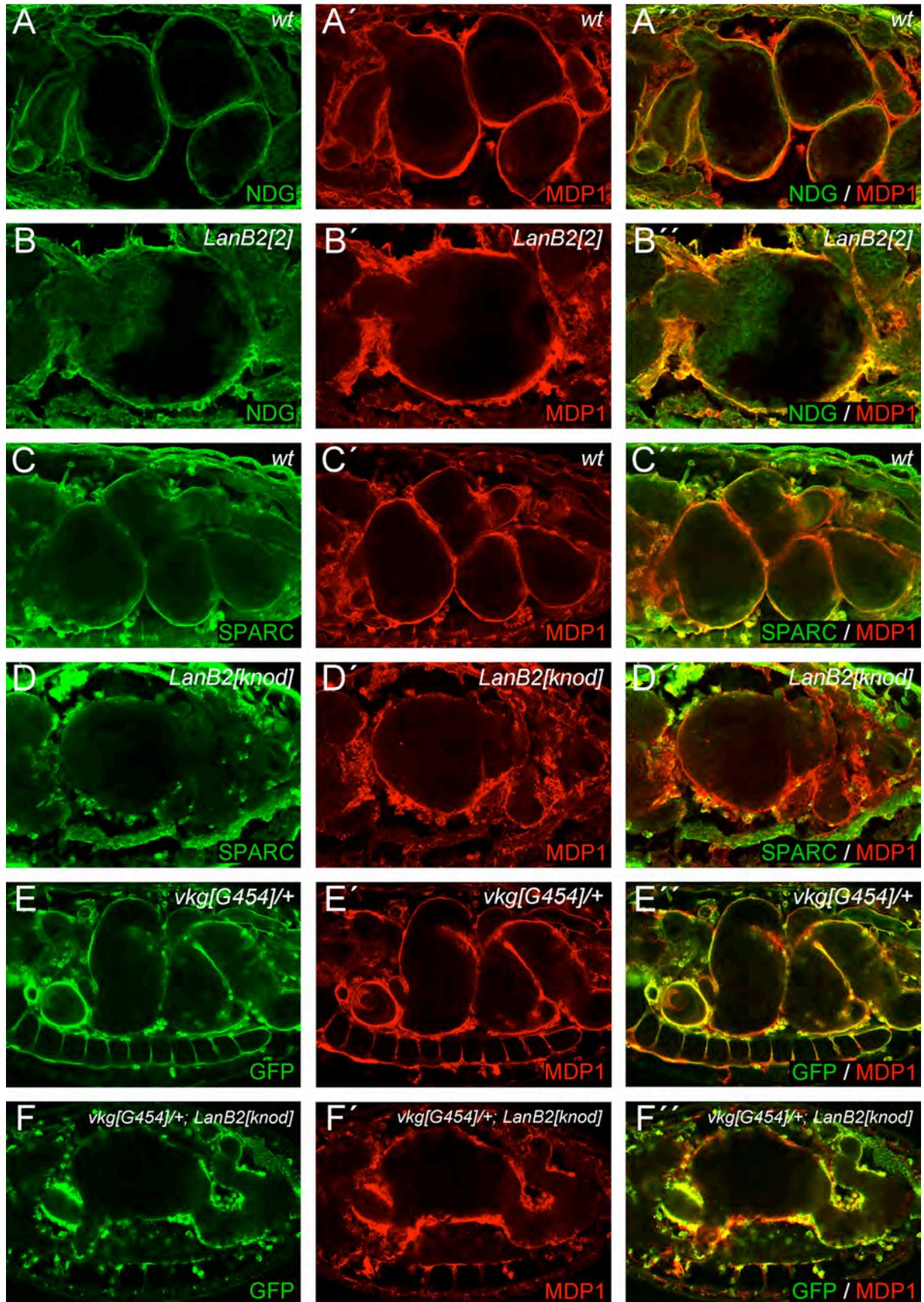
5.3.10. Aufbau der extrazellulären Matrix und der Basallamina in *LanB2*-Mutanten

Laminintrimere gelten als ein struktureller Hauptbestandteil der Basallaminae von *Drosophila* (Broadie et al., 2011). Da in *LanB2*-Mutanten die Sekretion von Laminin unterbleibt (Abb. 5.7 L; Abb. 5.18 H), stellen diese ein geeignetes System dar, um die Folgen einer Fehlentwicklung der ECM und Basallaminae aufgrund der Abwesenheit von Laminintrimeren zu analysieren. Dazu wurden wildtypische Kontrollen (*wt*, bzw. *vkg*^{G454/+}) und *LanB2*-mutante Embryonen mit Antikörpern gegen Nidogen/Entactin, MDP1 und SPARC (Akronyme für Macrophage Derived Protein 1 und Secreted Protein Rich in Cystein) gefärbt (Abb. 5.13). Der monoklonale Antikörper MDP1 wurde dabei zum Nachweis des ECM-Moleküls Papilin eingesetzt (Hortsch et al., 1998; Kramerova et al., 2000; Firth und Baker, 2007). In *wt*-Embryonen ist der Mitteldarm am Ende der Embryonalentwicklung von einer prominenten Basallamina umschlossen (Abb. 5.13 A, C und E). Innerhalb dieser Basallamina ist Nidogen (NDG) in einer dünnen Schicht exprimiert, die unmittelbar der Organoberfläche anliegt (Abb. 5.13 A). Die Expression von Papilin (nachgewiesen durch den MDP1-Antikörper) erstreckt sich dagegen auf einem breiteren Bereich um den Mitteldarm und überlappt daher nur partiell mit dem NDG-Signal (Abb. 5.13 A', A''). Auch in *LamininB2*-Mutanten sind NDG- und Papilin-Markierungen um den Mitteldarm vorhanden (Abb. 5.13 B, B'). Im Gegensatz zur wildtypischen Situation erscheint die ECM in den Mutanten allerdings unregelmäßig und zerfasert. NDG ist zudem nicht mehr in einer diskreten Schicht um den Mitteldarm lokalisiert und seine Expressionsdomäne überlagert nun komplett mit der MDP1-Markierung (Abb. 5.13 B''), was auf den Zusammenbruch der Basallamina hindeutet. Auch die Sekretion von SPARC, eines Kollagen IV-assoziierten und multifunktionalen Signalmoleküls innerhalb der ECM wird durch die Abwesenheit von *LanB2* beeinträchtigt. Im Wildtyp kann das, von den Hämocyten sekretierte, SPARC erst am Ende der Embryonalentwicklung innerhalb der Basallaminae detektiert werden (Martinek et al., 2002; Martinek et al., 2008). Deshalb findet sich im Stadium 16 nur eine dünne SPARC-positive Schicht im Randbereich der Basallamina (Abb. 5.13 C-C''). In *LanB2*-Mutanten ist SPARC dagegen fast ausschließlich in Hämocyten sowie dem Fettkörper lokalisiert und die Sekretion von SPARC in die ECM unterbleibt nahezu vollständig (Abb. 5.13 D-D'').

Zur Darstellung von Typ IV-Kollagen konnte das „Protein-trap“-Allel *viking*^{G454} (*vkg*^{G454} auch als *viking-GFP* bezeichnet) genutzt werden, das durch die Insertion eines künstlichen, GFP-kodierenden Exons in das *Kollagen IVα2*-homologe *viking* (*vkg*)-Gen erzeugt wurde (Morin et al., 2001). *vkg*^{G454/+}-Embryonen entwickeln sich wildtypisch, exprimieren allerdings eine GFP-markierte Version des Kollagen IVα2-Proteins in den Hämocyten, dem Fettkörper sowie

in einer durchgängigen Schicht um den embryonalen Darm und das Ventralganglion (Abb. 5.14 E). Die GFP-Expression überlappt dabei in weiten Teilen mit der Papilin-Markierung durch den MDP1-Antikörper (Abb. 5.13 E', E''). In *vkg*^{G454/+}; *LanB2*^{knod}-mutanten Embryonen ist die Kollagen IV-Expression stark reduziert und kann nur noch im Bereich der Cardia („Proventriculus“), um Teile des posterioren Mitteldarms sowie in Hämozyten und dem Fettkörper nachgewiesen werden. Im Bereich des zentralen Mitteldarms und um das ventrale Nervensystem sind darüber hinaus keine GFP-positiven Schichten mehr zu erkennen (Abb. 5.13 F-F''). Insgesamt führt der Verlust von LamininB2 in mutanten Embryonen sowohl zu einer reduzierten Sekretion einzelner Matrix-Moleküle als auch zur fehlerhaften Lokalisation von Proteinen innerhalb der ECM, was schlussendlich dem Aufbau einer strukturell und funktionell vollwertigen Basallamina entgegenwirkt.

Abbildung 5.13, folgende Seite: Aufbau der ECM und Basallamina in *LanB2* Mutanten. Wildtypische (*wt* in A-A'', C-C'' sowie *viking*^{G454/+}-Kontrollen in E-E'') und *LamininB2*-mutante (B-B'', D-D'', F-F'') Embryonen im Stadium 16 mit Antikörpermarkierungen gegen das extrazelluläre Matrix-Protein Papilin (MDP1, rot). Zusätzlich wurden entweder Nidogen/Entactin (NDG, grün in A, A'', B, B'') oder *Drosophila*-SPARC (SPARC, grün in C, C'', D, D'') nachgewiesen. Die Kollagen IV-Verteilung wurde anhand der GFP-Expression (Antikörpernachweis grün in E, E'', F, F'') des „Protein-trap“-Allels *viking*^{G454} (*vkg*^{G454}) dargestellt. Die entsprechenden Einzelmarkierungen in jeweils einer konfokalen Ebene sind in der Abbildung links und mittig dargestellt, der Overlay aus beiden Expressionsmustern rechts. A-D entsprechen Dorsal-, E-F Lateralansichten. (A-A'') NDG formt eine dünne Schicht innerhalb der MDP1-positiven Basallamina (BL) von *wt*-Embryonen. (B-B'') In der ECM von *LanB2*-Mutanten ist die Schichtung von NDG und MDP1 gestört. (C-C'') In *wt*-Embryonen lagert sich dSPARC der äußeren Basallamina des Mitteldarms an. (D-D'') In *LanB2*-Mutanten ist die Sekretion von dSPARC in die ECM stark verringert (E-E'') Die Expressionsmuster von Kollagen IV und MDP1 überlappen in wildtypischen *viking*^{G454/+}-Embryonen. (F-F'') Reduzierte Kollagen IV-Sekretion in *LanB2*-mutanten Embryonen.



5.3.11. Charakterisierung des Mitteldarmphänotyps von *LanB2*-Mutanten

Die Identifikation der *LamininB2*-Allele beruht auf dem charakteristischen Mitteldarmphänotyp der mutanten Embryonen (5.1, 5.4.5). Die frühe Expression von *LanB2* in Entoderm und Mesoderm, sowie die Einbettung der Mitteldarmgewebe durch die extrazelluläre Matrix lässt eine komplexe Interaktion zwischen der ECM und den einzelnen Mitteldarmgeweben vermuten. Um mehr über die Mechanismen zu erfahren, die dieser Interaktion zu Grunde liegen, sollte die Entwicklung der zirkulären und longitudinalen viszeralen Muskulatur sowie des Entoderms im Bezug auf die ECM vergleichend in *wt* und *LanB2*-mutanten Embryonen untersucht werden.

Analyse der zirkulären viszeralen Muskulatur

Zunächst wurden die viszeralen Bänder im Wildtyp und in *LanB2*-mutanten Embryonen im voll verlängerten Keimstreif mit FASIII-Antikörpern gefärbt, um einen möglichen Effekt von Laminin auf die viszerale Myoblastendetermination zu untersuchen (Abb. 5.14. A, B). In beiden Fällen besteht das viszerale Mesoderm zu diesem Zeitpunkt aus einer äußeren Gründerzellreihe, und den angrenzenden FCMs, was auf die Determination beider Zelltypen in den Mutanten hindeutet. Zur weiteren Analyse wurde die viszerale Myotubenstreckung mit Hilfe eines Fusionsprotein aus dem aktinbindenden C-Terminus von Moesin (engl. Akronym für membrane-organizing extension spike protein) und GFP sichtbar gemacht ($P\{UAS-Moesin::GFP\}TC2$; Chihara et al., 2003). Dazu wurde die Transgenexpression in *wt* und *LanB2*-mutanten Embryonen durch die Gal4-Enhancer-Trap-Insertion $P\{GawB\}CG5790^{NP1233}$ induziert, deren Insertionsort acht Basen vor dem 5'UTR des *Fasciclin III* (*FasIII*)-Gens liegt (Flybase, 1992). Tatsächlich spiegelt $P\{GawB\}CG5790^{NP1233}$ die Expression von *FasIII* im embryonalen viszeralem Mesoderm sowie den Speicheldrüsen wider (Abb. 5.14 C, D) und wird deshalb in dieser Arbeit als *FASIII-Gal4* bezeichnet. Durch den GFP-Antikörpernachweis von *FASIII-Gal4*-induziertem *UAS-Moesin::GFP* (*UMG* in Abb. 5.14) sind im viszeralem Mesoderm von *wt*-Embryonen im Stadium 13 vereinzelt filamentöse Fortsätze sichtbar, die aus den viszeralem Bändern herausragen (Abb. 5.14 C, Pfeile). Die Ausbildung dieser Fortsätze leitet das Auswachsen der Myotuben um das Entoderm ein und kann auch in der viszeralem Muskulatur von transheterozygoten *LanB2^{knod}/LanB2²* (als *LanB2^{trans}* bezeichnet)-Embryonen beobachtet werden (Abb. 5.14 D, Pfeile). Im Vergleich zur wildtypischen Situation erfolgt die Ausrichtung dieser Fortsätze allerdings nicht einheitlich entlang der dorso-ventralen Achse. Demnach könnte durch das Fehlen von Laminin die Orientierung der Muskeln während des dorso-ventralen Streckungsprozesses beeinträchtigt werden. Um

diese Vermutungen zu überprüfen, wurde die Aktinverteilung in Abhängigkeit von der ECM (markiert durch NDG Antikörper) im Wildtyp und *LanB2*-Mutanten analysiert (Abb. 5.14 E, F), da die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts eine grundlegende Voraussetzung für die Zellformveränderung, die Ausbildung von Zellfortsätzen und die Streckungsbewegung von Zellen darstellt (Pollard und Cooper, 2009). Darüber hinaus wurde mit spezifischen Antikörpern die Verteilung von Dystroglycan im viszeralem Mesoderm vom Wildtyp und *LanB2*-mutanten Embryonen untersucht (Abb. 5.14 G, H). Dystroglycan (DG) ist die Transmembrankomponente im Dystrophin-Glykoprotein-Komplex, einem membranassoziierten Multiprotein-Komplex, der Signale aus der ECM an das Aktin-Zytoskelett vermittelt (Gullberg und Ekblom, 1995; Greener und Roberts, 2000). Durch den TRITC-Phalloidin Nachweis wird deutlich, dass Aktin zum Zeitpunkt der dorso-ventralen Muskelstreckung an den Rändern der viszeralem Myotuben lokalisiert ist (Abb. 5.14 E). Darüber hinaus finden sich Anhäufungen von Aktin an den Randbereichen der viszeralem Bänder, in denen die Myotuben im direkten Kontakt zur NDG-positiven ECM stehen.

Im Vergleich zur wildtypischen Situation ist die ECM-Verteilung um die viszeralem Bänder von *LanB2*-mutanten Embryonen zu diesem Zeitpunkt auf wenige Bereiche reduziert (Abb. 5.14 D). Interessanterweise orientieren sich die viszeralem Myotuben mit ihren Spitzen in Richtung dieser „ECM-Flecken“ und akkumulieren Aktin an den Kontaktzonen (Abb. 5.14 D, Pfeile).

Einen ähnlichen Befund liefert die Analyse der Dystroglycanverteilung im viszeralem Mesoderm von Wildtypen und *LanB2*-Mutanten (Abb. 5.14 G, H). In der wildtypischen Situation ist DG in der Zellmembran der Myotuben exprimiert und konzentriert sich dort vor allem an den Rändern der viszeralem Bänder, die dem Entoderm (markiert durch FASII-Antikörper) distal aufliegen. Auch in *LanB2*-Mutanten sind Anhäufungen von DG entlang der Membranen von viszeralem Myotuben zu beobachten. Im Gegensatz zur wildtypischen Entwicklung werden diese Anhäufungen nicht homogen in allen viszeralem Myotuben ausgebildet und beschränken sich nicht auf die dorsalen und ventralen Randbereiche der viszeralem Bänder (Abb. 5.14 H). Darüber hinaus bedeckt das viszerale Mesoderm in den Mutanten das darunterliegende Entoderm nicht mehr vollständig.

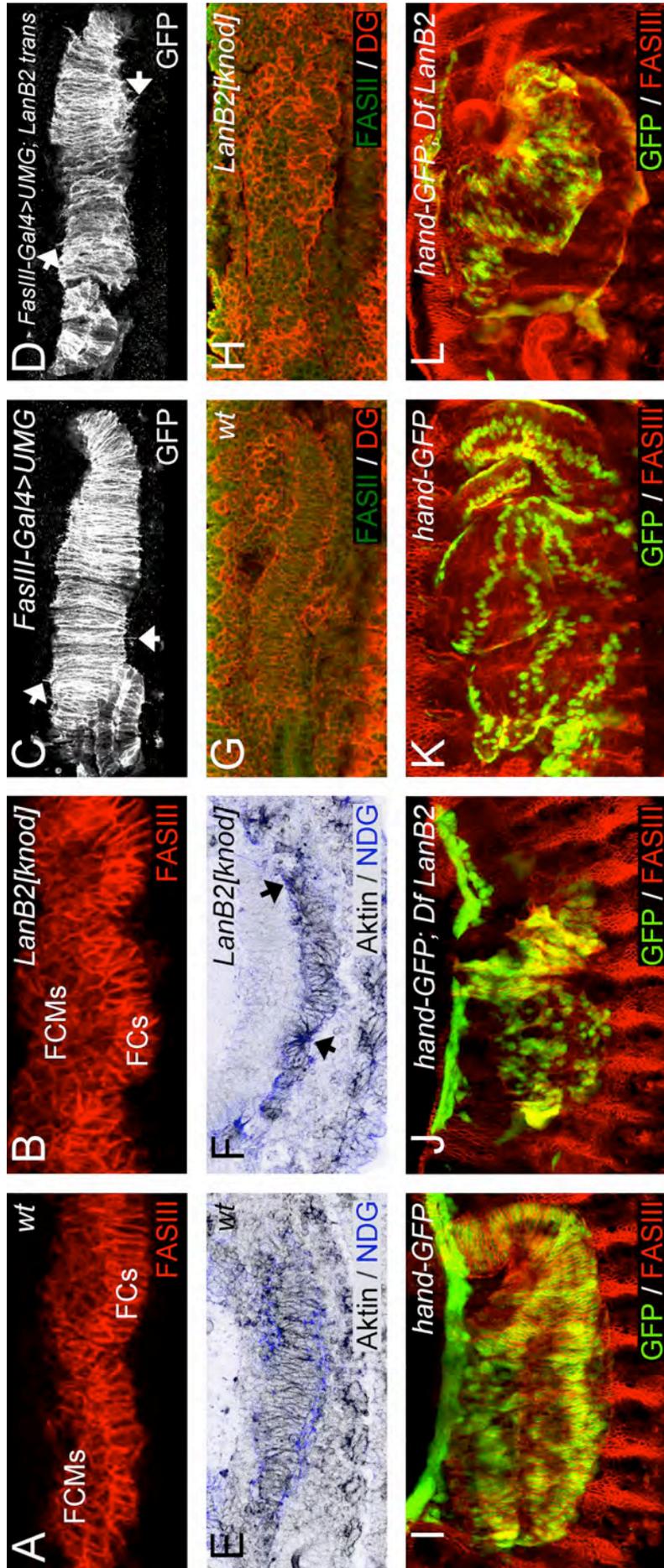


Abbildung 5.14, vorherige Seite: Entwicklung der zirkulären viszeralen Muskulatur in *LamininB2*-Mutanten. (A, B) Ausschnitte von Dorso-lateralansichten des anti-Fasciclin III (FASIII, rot)-markierten viszeralen Mesoderms von *wt* und *LanB2^{knod}*-Embryonen im Stadium 11. In beiden Situationen sind viszerale Muskelgründerzellen (Founder cells, FCs) und fusionskompetente Myoblasten (Fusion competent myoblasts, FCMs) ausgebildet. (C, D) Darstellung von filamentösen Fortsätzen (Pfeile in den Lateralansichten) im viszeralem Mesoderm von Wildtypen (*wt* in C) und *LanB2^{knod}*-Embryonen (D) im Stadium 13 durch Fasciclin III-Gal4 (FASIII-GAL4)-induzierte UAS-Moesin::GFP-Expression (UMG, nachgewiesen mit Antikörpern gegen GFP). (E, F) Markierung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin-TRITC (Schwarz/Weiß-Negativdarstellung) und Antikörpernachweis des ECM-Proteins Nidogen (NDG, blau) in Lateralansichten von *wt* (E) und *LanB2^{knod}*-Mutanten (F) im Stadium 13. (G, H) DG^{EX8}-Antikörpernachweis von Dystroglycan (DG, rot) in den viszeralen Muskeln von *wt* (G) und *LanB2^{knod}*-Embryonen (H) im Stadium 13. In den Lateralansichten wurde zusätzlich das Entoderm mit FasciclinII-Antikörpern (FASII, grün) markiert. (I-L) Antikörpernachweis von FasciclinIII (FASIII, rot) und der *hand-GFP*-Reporterexpression (GFP, grün) in *wt* (I, K) und homozygoten Embryonen einer *LamininB2*-Defizienz (*Df LanB2*) in den Stadien 14 (I, J) und 16 (K, L).

Zum Nachweis der finalen Myotubenstreckung wurde ein kernlokalisierter *hand-GFP*-Reporter (5.3.7) verwendet, der nicht nur im Dorsalgefäß sondern auch in allen Kernen der fusionierten viszeralen Muskulatur exprimiert ist (Abb. 5.14 I-L; Sellin et al., 2006). Da sich während der finalen Myotubenstreckung der Abstand zwischen den beiden Zellkernen eines viszeralen Myotubus zunehmend vergrößert (Klapper et al., 2002), kann das Auswachsen der viszeralen Myotuben auch indirekt durch die Separation der viszeralen Nuclei beschrieben werden. In *wt*-Embryonen ist bereits im Stadium 14 die Separation der viszeralen Kerne deutlich erkennbar (Abb. 5.14 I). Zu diesem Zeitpunkt liegen die einzelnen Myotuben noch eng zusammen und sind teilweise gegeneinander verschoben, was eine eindeutige Zuordnung der Kerne zu einem bestimmten Myotubus erschwert. Bis zum Stadium 16 ordnen sich die Kerne der nebeneinander liegenden Myotuben schließlich in zwei Doppel-Reihen beidseitig des gekammerten Mitteldarms an (Abb. 5.14 J). Auch in den Mutanten kann die Separation der viszeralen Kerne beobachtet werden (Abb. 5.14 K). Jedoch ist der Abstand zwischen den Kernen im Vergleich zum *wt* in einigen Bereichen der Mitteldarmmuskulatur deutlich verringert, in anderen Regionen hat die Trennung der Kerne nicht stattgefunden. Am Ende der Embryonalentwicklung besteht die viszerale Muskulatur in den Mutanten zum überwiegenden Teil aus Myotuben mit stark eingeschränktem Streckungswachstum und die viszeralen Kerne ordnen sich nicht in zwei Doppelreihen beiderseits des Darms an. Darüber hinaus sind große Löcher in der viszeralen Muskulatur erkennbar, was auf die Perforation des Mitteldarmepithels hindeuten könnte (Abb. 5.14 L).

Analyse des Entoderms

Zur Analyse der Entodermentwicklung wurden *wt* und *LanB2*-mutante Embryonen mit Antikörpern gegen den Filamin-N-Terminus (FLN; Sokol und Cooley, 2003) gefärbt. Außerdem wurde die ECM mit NDG-Antikörpern markiert (Abb. 5.15 A, B, E, F). Filamin, das im *Drosophila*-Genom vom *cheerio*-Locus kodiert wird (Li et al., 1999; Sokol und Cooley, 1999),

spielt als Protein-Homodimer eine entscheidende Rolle während der Quervernetzung und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Sokol und Cooley, 2003). Darüber hinaus ist Filamin ein potentieller, zytosolischer Interaktionspartner von Transmembranrezeptoren aus der Integrin-Familie und wird während der Embryogenese von *Drosophila* stark in den wandernden Entodermprimordien exprimiert (Devenport und Brown, 2004). In *wt*-Embryonen im Stadium 13 sind die beiden FLN-positiven Mitteldarmprimordien bereits in der Mitte des Embryos fusioniert (Abb. 5.15 A, hervorgehoben durch eine punktierte Linie). Durch die Markierungen der ECM an den Randbereichen der viszeralen Bänder ist zudem zu erkennen, dass nahezu das gesamte Entoderm auf seiner distalen Seite von der viszeralen Muskulatur bedeckt wird (Abb. 5.15 A). In homozygoten *LanB2^{knod}*-Embryonen ist die Fusion der Mitteldarmanlagen im Vergleich zur Normalentwicklung verzögert (Abb. 5.15 B, gepunktete Linien markieren die Grenzen der Mitteldarmprimordien) und auch die viszeralen Bänder bedecken nur einen Teil des Entoderms. In der wildtypischen Situation bilden die primär sphärischen Entodermzellen kurz darauf ein Epithel aus säulenförmigen Zellen aus, das auf seiner basalen Seite der NDG-positiven Basallamina aufliegt (Abb. 5.15 C). Zum Nachweis der epithelialen Polarität der Mitteldarmzellen wurden diese mit Antikörpern gegen das *Drosophila*-epitheliale-Cadherin (DE-Cad) markiert. Im wildtypischen Entoderm ist DE-Cadherin asymmetrisch auf der apikalen Seite der Zellen lokalisiert, was auf eine erfolgreiche mesenchymal-epitheliale Transition hindeutet (Abb. 5.15 C; Devenport und Brown, 2004). In *LanB2*-mutanten Embryonen verbleibt dagegen ein Großteil des Entoderms in den Bereichen des anterioren und posterioren Mitteldarms und nur wenige Zellen wandern zum präsumptiven Fusionsort der Entodermprimordien (Abb. 5.15 D). Auch während der weiteren Entwicklung behalten die Entodermzellen von homozygoten *LanB2*-Mutanten ihre rundliche Morphologie bei und bilden keine geschlossene Zellschicht aus. Darüber hinaus deutet die ubiquitäre Verteilung von DE-CAD in den Zellmembranen auf den Verlust eines funktionalen Mitteldarmepithels in den Mutanten hin (Abb. 5.15 D). Am Ende der Embryonalentwicklung sind in *LanB2*-Embryonen große Löcher innerhalb des Entoderms sichtbar, durch die stellenweise der Dotter in die Leibeshöhle austritt. Zudem kommt es am Ende der Embryogenese zunehmend zur Ablösung der Basallamina von den Mitteldarmzellen (Abb. 5.15 F) und auch die wildtypische Kammerung des Mitteldarms durch die viszerale Muskulatur (Abb. 5.15 E) unterbleibt in *LanB2*-mutanten Embryonen.

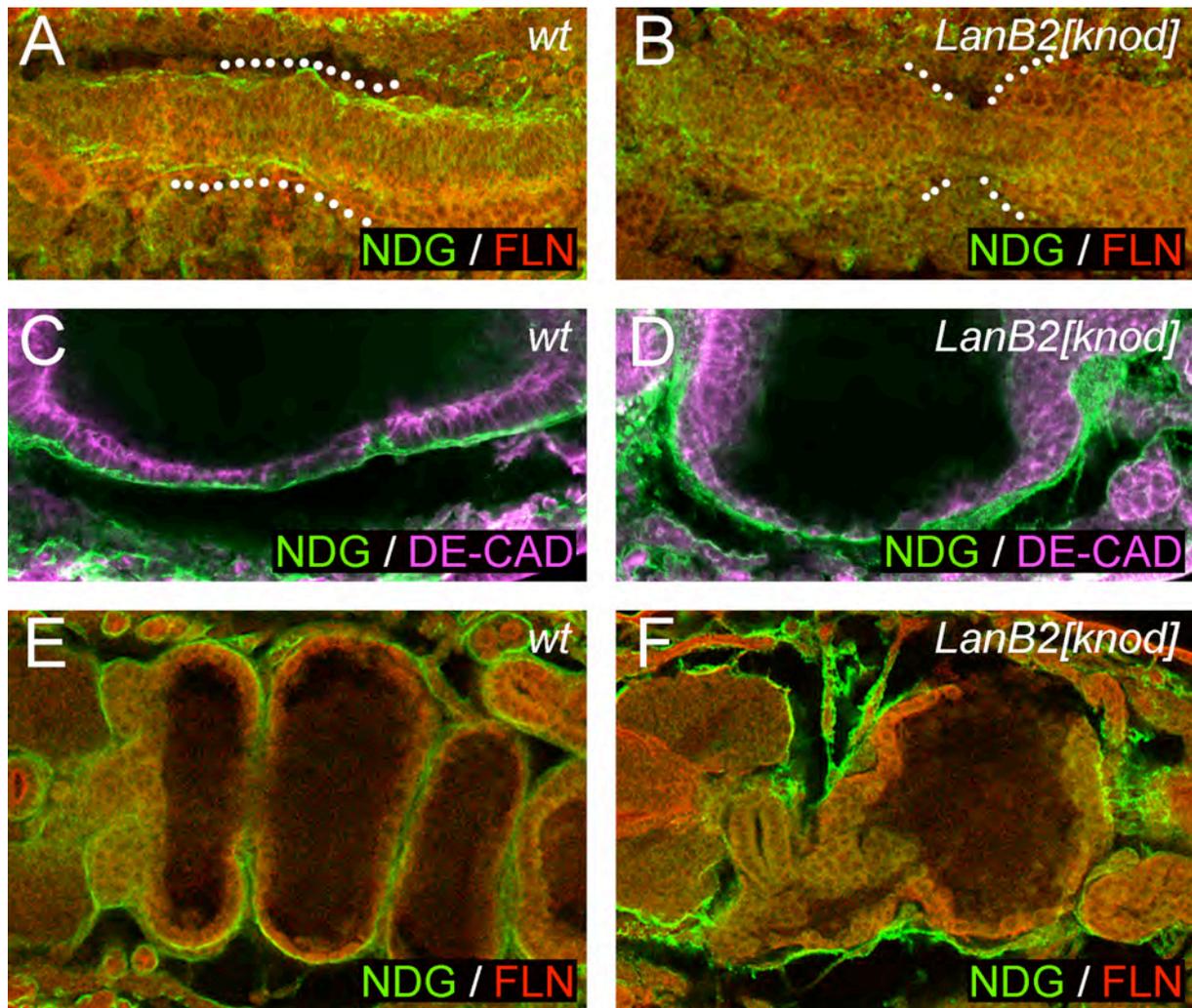


Abbildung 5.15: Morphologische Analyse der Entodermentwicklung in *LanB2*-Mutanten. Markierungen des Entoderms von *wt* (A, C, E) und *LanB2^{knod}*-mutanten (B, D, F) Embryonen im Stadium 12/13 (A, B) 15 (C, D) bzw. 16 (E, F) mit Antikörpern gegen den Filamin-N-Terminus (FLN, rot in A, B, E, F) oder gegen das *Drosophila*-epitheliale-Cadherin (DE-CAD, Magenta in C, D). Die ECM ist mit Nidogen/Entactin-Antikörpern (NDG, grün in A-F) markiert. Die Detailansichten in A und B sind lateral orientiert, C-F entsprechen Dorsalan-sichten des embryonalen Mitteldarms. (A) Während des Keimstreifrückzugs fusionieren die Mitteldarmprimordien von *wt*-Embryonen und die ECM konzentriert sich in den Randbereichen der viszeralen Muskulatur. (B) In *LanB2*-Mutanten ist die Fusion der Entodermanlagen verzögert und die NDG-Ablagerungen reduziert. (C) Apikale Lokalisation von DE-CAD im Mitteldarmepithel eines *wt*-Embryos im Stadium 15. Die Epithelzellen liegen einer NDG-positiven Basallamina auf. (D) Fehllokalisierung von DE-CAD, Migrationsdefekte im Entoderm und Störungen in der ECM-Morphologie von *LanB2*-Mutanten. (E) Dem gekammerten Mitteldarm von *wt*-Embryonen im St 16 liegt eine dünne Basallamina auf. (F) In *LanB2*-Mutanten im St 16 ist der Mitteldarm perforiert und die Basallamina löst sich vom Entoderm ab.

Analyse der longitudinalen viszeralen Muskulatur

Zur Analyse der longitudinalen viszeralen Muskulatur wurde die Expression des *croc-lacZ*-Reporters (5.3.5) in *wt* und homozygoten *LanB2*-Embryonen vergleichend untersucht (Abb. 5.16). In der wildtypischen Situation stehen die longitudinalen Muskelzellen während ihrer anterioren Wanderung im engen Kontakt zu den darunter liegenden, FASIII-positiven Bändern der zirkulären Muskulatur (Abb. 5.16 A). Interessanterweise bedecken die longitudinalen Muskelzellen das posteriore Drittel der viszeralen Bänder nahezu komplett. Weiter anterior spaltet sich die longitudinale Muskulatur dagegen in zwei Äste auf, und die länglichen Myoblasten setzen ihre Wanderung entlang der dorsalen und ventralen Ränder der zirkulären Muskulatur fort. In *LanB2*-Mutanten fällt zunächst eine starke Reduzierung an wandernden longitudinalen Muskelzellen auf. Zwar stehen diese Zellen immer noch in engem Kontakt mit den viszeralen Bändern, weisen jedoch eine rundliche Morphologie auf (Abb. 5.16 B). Um den Einfluss der ECM auf diesen Prozess genauer zu untersuchen, wurden *croc-lacZ*- und *croc-lacZ; LanB2²*-Embryonen mit MDP1-Antikörpern markiert. Dabei zeigt sich, dass die longitudinalen Muskelzellen während ihrer Wanderung immer stärker von der ECM umschlossen werden, die vermutlich von den angrenzenden Hämocyten sekretiert wird (Abb. 5.16 C, Pfeilspitzen markieren die MDP1-positive Hämocyten). Zwar finden sich Hämocyten (Pfeilspitzen) und ECM noch neben den viszeralen Bändern mutanter Embryonen (Abb. 5.16 D), die longitudinalen Muskeln an sich werden allerdings kaum noch von der ECM bedeckt. Darüber hinaus sind vermehrt *croc-lacZ*-positive Zellen zu beobachten, die sich senkrecht zur Hauptwanderrichtung der longitudinalen Muskulatur orientieren (Abb. 5.16 D, Pfeil).

Während der weiteren Entwicklung kommt es im *wt* zur Ausbildung einer hoch strukturierten Schicht aus ECM und den gestreckten longitudinalen Muskeln, die sich über den gesamten Mitteldarm ausbreitet (Abb. 5.16 E). In den homozygoten *croc-lacZ; LanB2²*-Mutanten findet diese Differenzierung dagegen nur noch in den Regionen des zukünftigen Mitteldarms statt, in denen die viszeralen Myoblasten von zahlreichen Hämocyten umgeben sind (Abb. 5.16 F, markiert durch eine gepunktete Linie). Der überwiegende Teil der longitudinalen Muskulatur besteht dagegen aus Zellen mit rundlicher bis sternförmiger Morphologie, die nicht in die ECM eingebettet sind (Abb. 5.16 F, Pfeil).

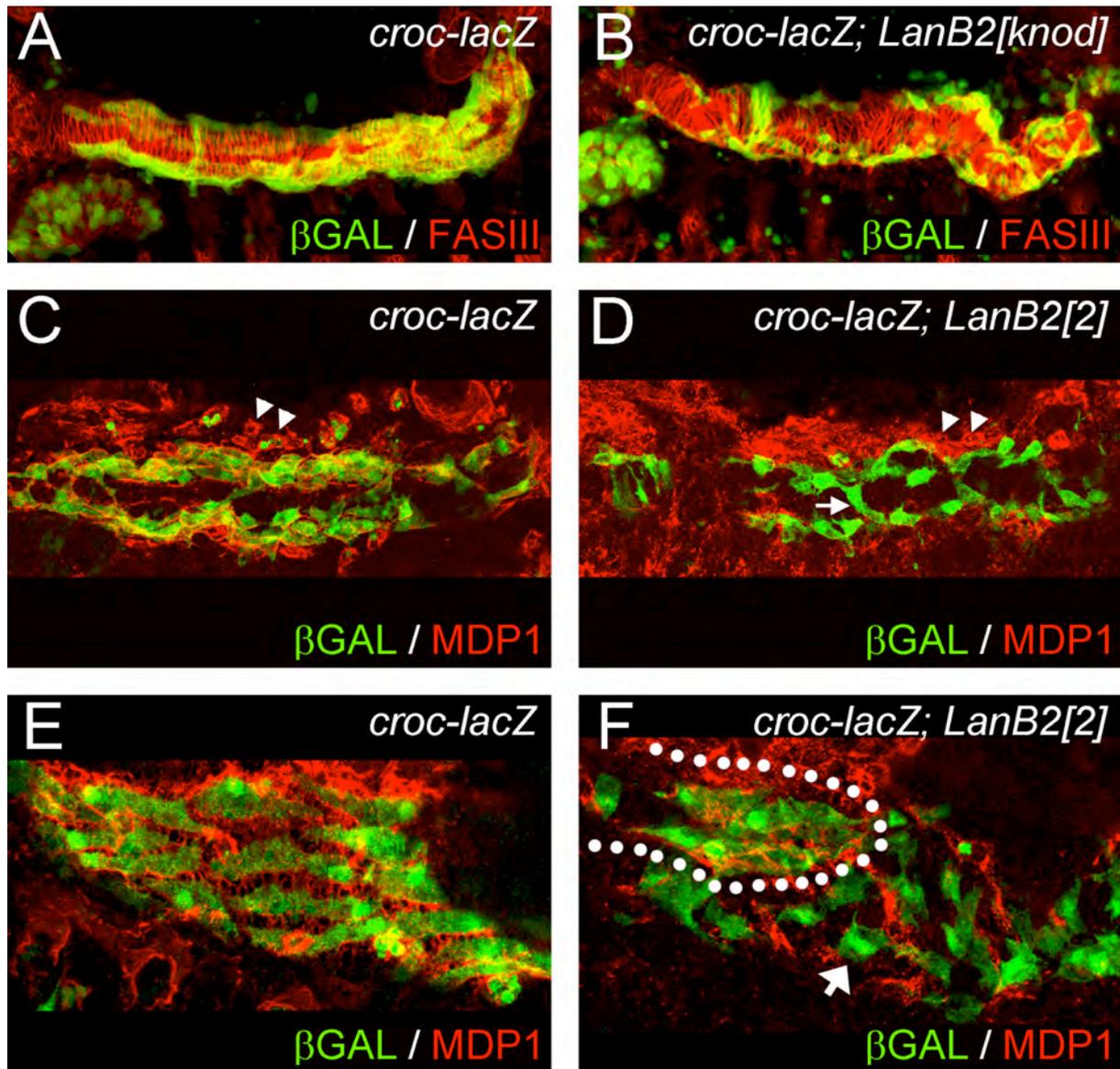


Abbildung 5.16: Analyse der longitudinalen viszerale Muskulatur in *LamininB2*-Mutanten. (A-F) β -Galaktosidase-Antikörpernachweis (β -GAL, grün) der *crocodile-lacZ* (*croc-lacZ*)-Reporterexpression in *wt* (links) und *LanB2*-mutanten Embryonen (rechts) in den Stadien 12/13 (A-D) und 14 (E, F). Zusätzlich wurde die zirkuläre viszerale Muskulatur mit Fasciclin III-Antikörpern (FASIII, rot in A und B) oder die ECM mit den MDP1-Antikörpern gegen Papilin (rot in C-F) markiert. (A, B) In *wt* und *LanB2*-Mutanten wandern die longitudinalen Muskelvorläufer auf den zirkulären Myotuben. (C) In der wildtypischen Situation sind longitudinale Muskelvorläufer in die ECM eingebettet und wandern nach anterior. (D) In *LanB2*²-Mutanten sind longitudinale Muskelzellen nur lose mit der fragmentierten ECM assoziiert und kreuzen häufig die Hauptwanderungsrichtung. (E) Regelmäßige Anordnung von ECM und langgestreckten longitudinalen Muskeln im *wt*-Embryo. (F) In *LanB2*-Embryonen ist die longitudinale Muskeldifferenzierung auf die Regionen mit ECM-Resten beschränkt (markiert durch eine gepunktete Linie), sonst herrschen rundliche Myoblasten (Pfeil) vor.

Entwicklung von Cardia („Proventriculus“) und Magenblindsäcken

Im Zuge der regionalen Differenzierung des Mitteldarms (St 16-17) entsteht durch die Einstülpung des posterioren Vorderdarmabschnitts in den anterioren Mitteldarm die Cardia (Poulson, 1950; King, 1988). In der Literatur hat sich mittlerweile der Begriff „Proventriculus“ für diese Struktur etabliert, welcher auch im Folgenden verwendet wird. In FASIII-Antikörperfärbungen lässt sich der „Proventriculus“ anhand der Membranmarkierungen im Vorderdarmepithel, im kubischen Epithel des anterioren Mitteldarms sowie in der viszeralen Muskulatur darstellen (Abb. 5.17 A). In *LanB2*-mutanten Embryonen stülpt sich das posteriore Vorderdarmende nicht in den anterioren Mitteldarm ein, und kommt als ringförmige Struktur vor diesem zu liegen (Abb. 5.17 B). Darüber hinaus ist die FASIII-Markierung in den Zellen des anterioren Mitteldarms kaum noch zu erkennen, was auf den Verlust der Epithelfunktion dieses Gewebes hindeuten könnte.

Ein weiteres Merkmal der regionalen Mitteldarmdifferenzierung ist das Auswachsen von vier Magenblindsäcken aus dem anterioren Teil der ersten Mitteldarmkammer (Poulson, 1950). Um die Entwicklung der Magenblindsäcke indirekt zu verfolgen wurde die umgebende viszerale Muskulatur mit Hilfe des *hand-GFP*-Reporters und FASIII-Antikörpern markiert (Abb. 5.17 C, D). In *wt*-Embryonen im Stadium 16 wachsen die vier Magenblindsäcke aus dem anterioren Mitteldarm aus und weisen mit ihren Enden in Richtung der Speicheldrüsen (Abb. 5.17 C, Pfeile). In *LanB2*-Mutanten haben die Magenblindsäcke nur noch an ihrer Basis Kontakt zur ersten Mitteldarmkammer und sind im Vergleich zur wildtypischen Situation vergrößert (Abb. 5.17 D, Pfeile).

Zusammenfassend spielt Laminin eine entscheidende Rolle bei der Anordnung der viszeralen Gewebe während des Keimstreifrückzugs. Dort beeinflusst es vor allem die gerichtete Migration von Entoderm und longitudinalen Myoblasten entlang der viszeralen Muskulatur. Während der weiteren Entwicklung kommt es zum Verlust der epithelialen Polarität im Entoderm und zur Reduzierung der viszeralen Muskelsteckung entlang der dorso-ventralen Achse. Gegen Ende der Embryonalentwicklung kann zunehmend der Adhäsionsverlust zwischen den viszeralen Geweben beobachtet werden. Darüber hinaus wird Laminin auch während der regionalen Differenzierung des Mitteldarms für die korrekte Ausbildung von „Proventriculus“ und Magenblindsäcken benötigt.

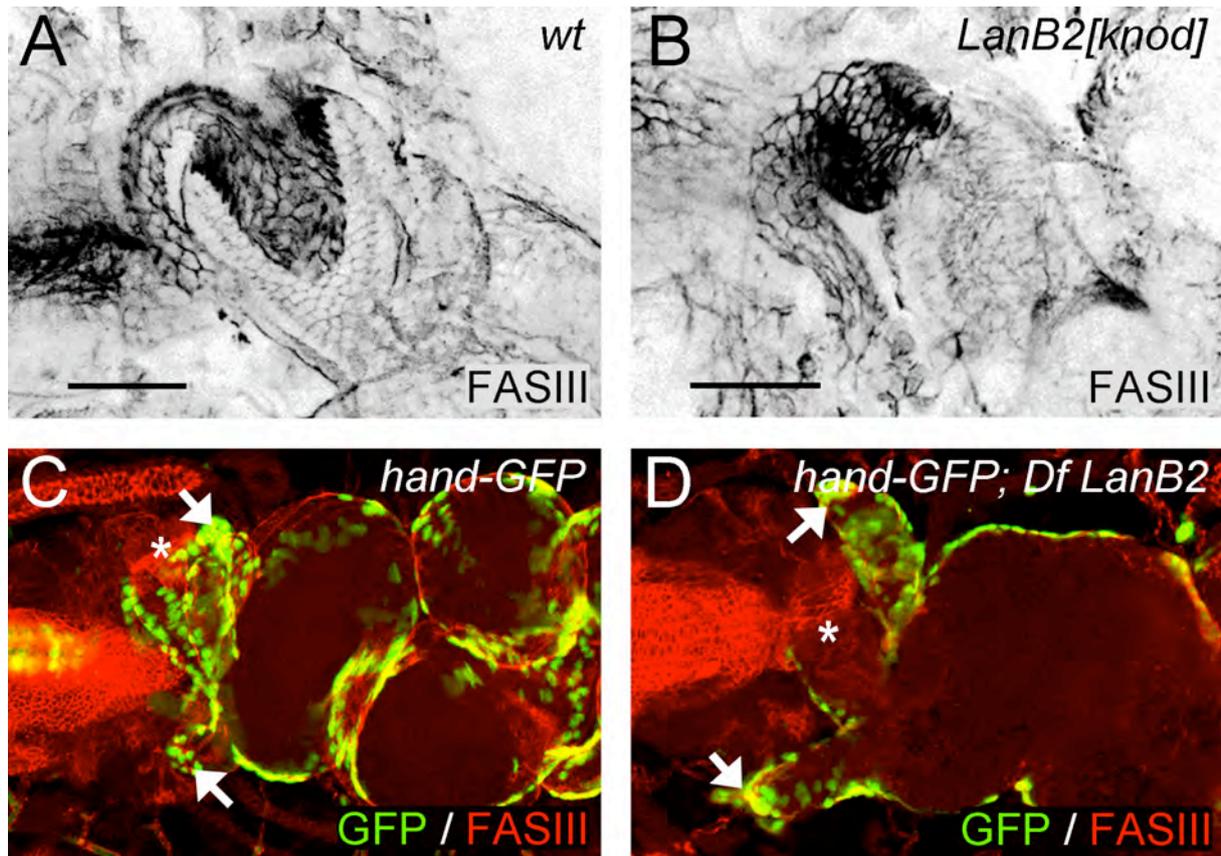


Abbildung 5.17: Morphologische Analyse von Cardia („Proventriculus“) und Magenblindsäcken. Fascielin III-Antikörpermarkierungen (FASIII, Schwarz/Weiß-Negativdarstellung in A und B, rot in C und D) des „Proventriculus“ (Cardia) sowie in Vorder- und Mitteldarm. Dargestellt sind Ventralansichten von wildtypischen (*wt*) und *LanB2*-Embryonen im Stadium 16. Der Nachweis der *hand-GFP*-Reportergenexpression in C und D erfolgte mit GFP-Antikörpern (grün). (A) „Proventriculus“ in einem *wt*-Embryo am Ende der Embryogenese. (B) In *LanB2*-Mutanten ist das posteriore Vorderdarmende nicht in den anterioren Mitteldarm eingestülpt. (C) In wildtypisch entwickelten *hand-GFP*-Kontrollen bilden sich vier schmale Magenblindsäcke (Pfeile) am anterioren Bereich der ersten Mitteldarmkammer aus. (D) In *LanB2*-Mutanten sind die Magenblindsäcke (Pfeile) nicht korrekt positioniert und erweitert. *= Position der Cardia in C und D. Die Messbalken (A, B) entsprechen 25 µm.

5.3.12. Vergleichende Analyse der Mitteldarmmorphologie von unterschiedlichen Lamininmutanten

Aufgrund der Identifikation und Charakterisierung von *LamininA* (*LanA*) und *wingblister* (*wb*), zwei Genen, die für verschiedene Laminin α -Untereinheiten kodieren, wurde die Existenz von zwei unterschiedlichen Lamininheterotrimeren postuliert (Kusche-Gullberg et al., 1992; Martin et al., 1999). Durch den Vergleich von *LamininB2*-Mutanten, in denen keine Laminintrimere mehr gebildet werden können, mit *wb*; *LanA*-Doppelmutanten ist es nun möglich dies zu überprüfen. Dazu wurde die Entwicklung des embryonalen Mitteldarms und der viszeralen Basallamina in transheterozygoten *LanA*⁹⁻³²/*Df(3L)Exel8101* (*Df LanA*)-, *wb*^{HG10}/*Df(2L)ED8186* (*Df wb*)- sowie *LanB2*^{knod}-, *da-Gal*>*LanB2RNAi*-Embryonen und *wb*^{SF25}; *LanA*⁹⁻³²-Doppelmutanten mit Antikörpern gegen β 3-Tubulin (β 3TUB) und Nidogen (NDG) vergleichend analysiert (Abb. 5.18 A-F'). *LanA*⁹⁻³² ist ein Nullallel von *LamininA*

(Kusche-Gullberg et al., 1992), wb^{HG10} und wb^{SF25} wurden bislang nicht molekular charakterisiert, gehören aber zu den stärksten analysierten wb -Allelen und weisen vergleichbare Phänotypen auf (nicht gezeigt; siehe die Studien von Martin et al., 1999).

In der wildtypischen Situation (St 16) formt die zirkuläre viszerale Muskulatur zusammen mit der sie umgebenden, NDG-positiven ECM eine sehr schmale Schicht um den gekammerten Mitteldarm (Abb. 5.18 A). In *LanB2*-mutanten Embryonen (Abb. 5.18 B) kommt es zu Differenzierungsdefekten in der viszeralen Muskulatur und zum Verlust der Adhäsion zwischen den viszeralen Geweben. Darüber hinaus sind am Ende der Embryonalentwicklung vermehrt NDG-positive Fragmente an variablen Positionen im Embryo zu beobachten. Diese Defekte lassen sich auch mit Hilfe eines *da-Gal4>LanB2RNAi*-induzierten „knock-downs“ von *LanB2* reproduzieren (Abb. 5.18 C). Im Vergleich zu *LanB2*-Mutanten, kommt es in *da-Gal4>LanB2RNAi*-Embryonen stellenweise zur Ausbildung von NDG-positiven Schichten entlang der Mitteldarmmuskulatur. Transheterozygote *LanA⁹⁻³²/Defizienz LanA*-Embryonen weisen dagegen eine wildtypische Kammerung des Mitteldarms durch die viszerale Muskulatur auf (Abb. 5.18 D). Interessanterweise ist in den Embryonen die Lokalisation von NDG stark gestört und es kommt zur punktförmigen NDG-Anhäufungen entlang der Basallaminae (Abb. 5.18 D´). Obwohl auch für wb^{HG10} und wb^{SF25} eine wildtypische Mitteldarmentwicklung beschrieben wurde (Martin et al., 1999), kommt es in diesen Mutanten (nicht gezeigt) sowie in $wb^{HG10}/Defizienz\ wb$ -Embryonen (Abb. 5.18 E) zur Störungen während der Kammerung des Mitteldarms. Die viszerale Muskulatur von wb -mutanten Embryonen bildet zwar noch eine geschlossene Schicht um den Darm aus, die Proportionen der einzelnen Darmkammern weichen aber von der wildtypischen Entwicklung ab. In wb -Mutanten wird auch eine NDG-positive ECM-Schicht um den Darm gebildet, allerdings kommt es in einigen Bereichen zur Ablösung der ECM von der viszeralen Muskulatur (Abb. 5.18 E´). $wb^{SF25}; LanA^{9-32}$ -Doppelmutanten phänokopieren die viszerale Morphologie von *LanB2^{knod}*- und *da-Gal4>LanB2RNAi*-Embryonen (Abb. 5.18 F). Bei genauerer Betrachtung sind Defekte bei der NDG-Lokalisation stellenweise schwächer ausgeprägt als in *LanB2^{knod}*-Mutanten (Abb. 5.18 F´). Auch durch eine Analyse der Lamininverteilung lassen sich Unterschiede zwischen *LanB2*-Mutanten und $wb^{SF25}; LanA^{9-32}$ -Doppelmutanten nachweisen (Abb. 5.18 G-I). So ist sekretiertes Laminin (LAN) im St 16 in allen Basallaminae von *wt*-Embryonen nachweisbar (Abb. 5.18 G). In *LanB2^{knod}*-Mutanten können mit dem verwendeten Antikörper keine sekretieren Laminintrimere nachgewiesen werden (Abb. 5.18 H). Dagegen sind in $wb^{SF25}; LanA^{9-32}$ -Doppelmutanten zahlreiche punktförmige LAN-Markierungen im Fettkörper, den Hämözy-

ten und der viszeralen Muskulatur vorhanden. Im Vergleich zur wildtypischen Situation werden allerdings keine Bereiche in der Basallamina markiert (Abb. 5.18 I).

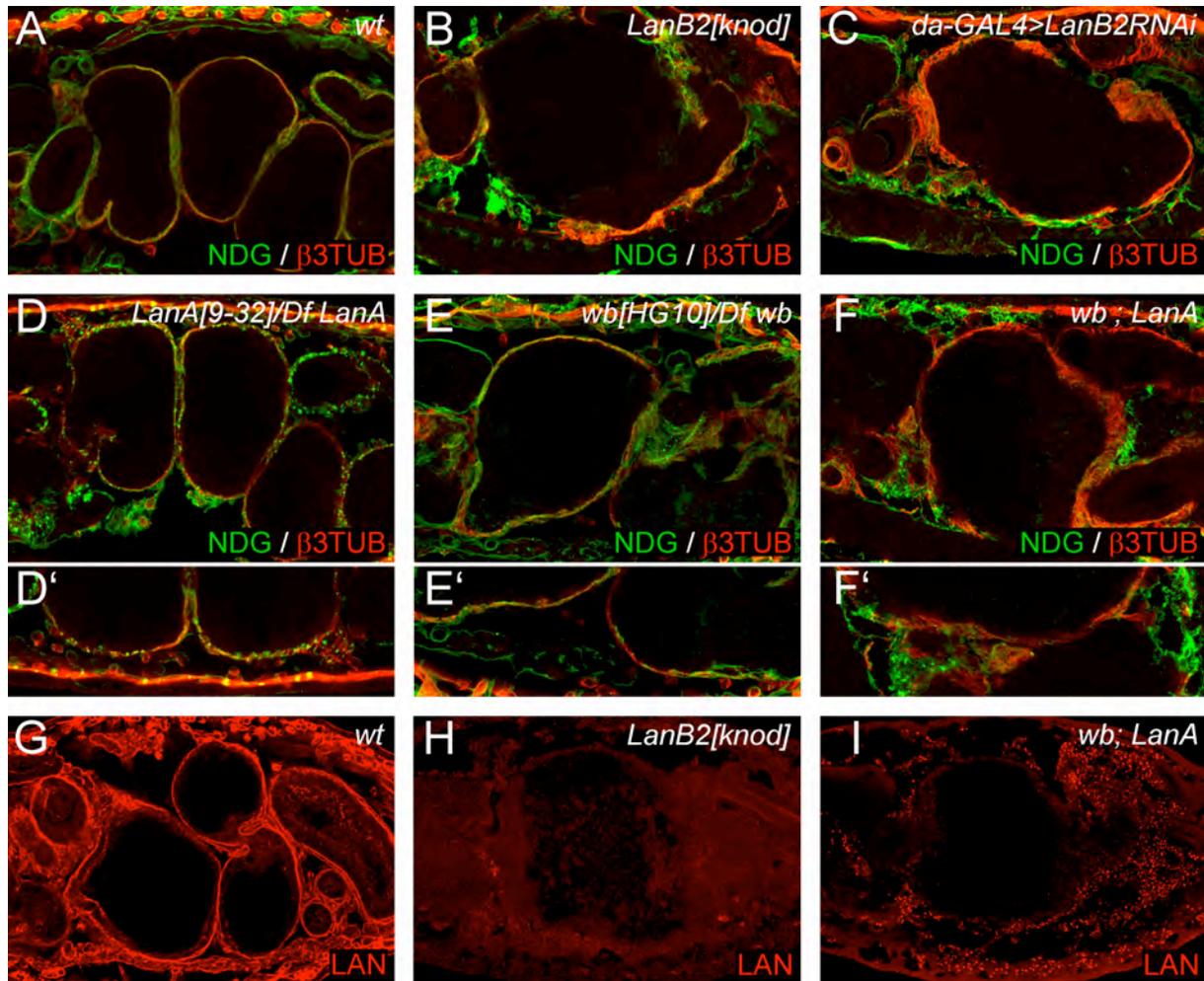


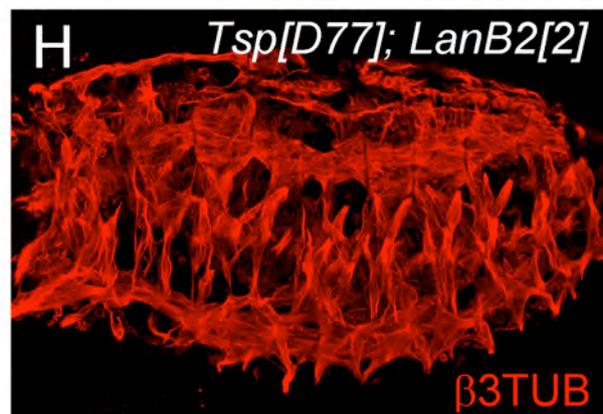
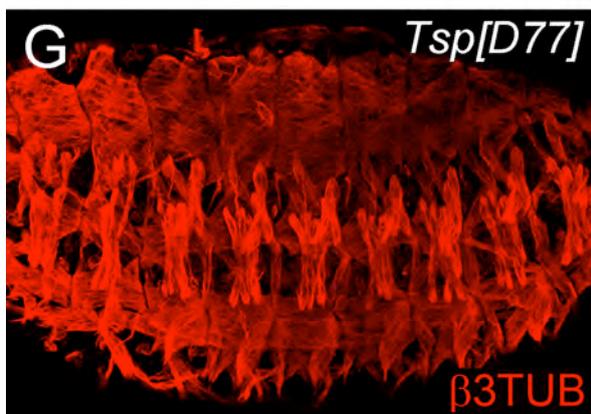
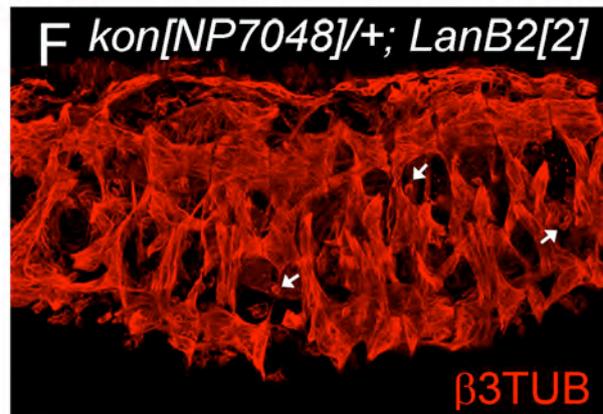
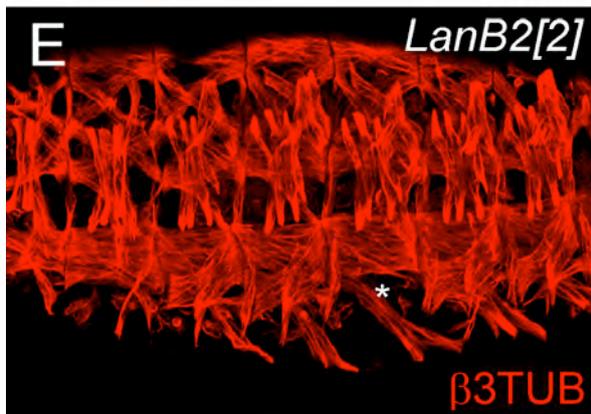
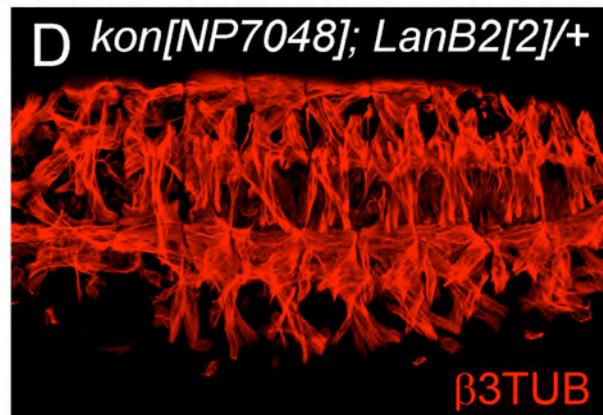
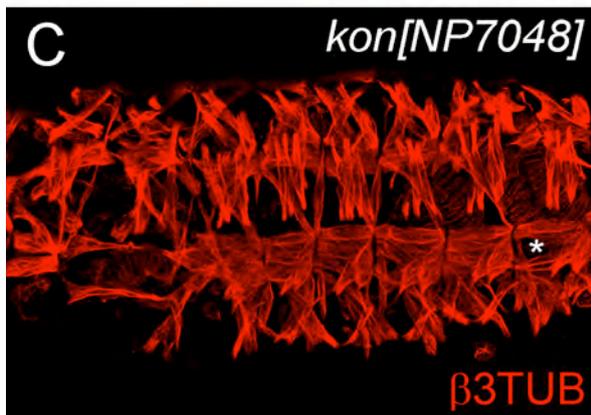
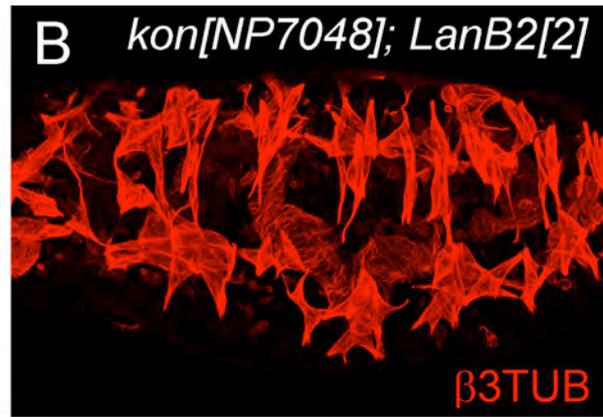
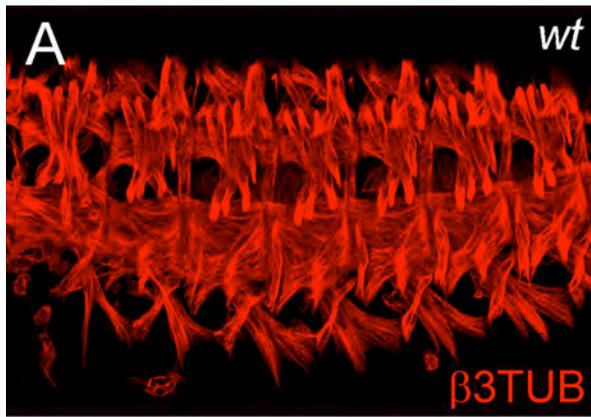
Abbildung 5.18: Analyse der viszeralen Morphologie und der ECM in den unterschiedlichen Laminin Mutanten. Anti β 3-Tubulin (β 3TUB, rot)-Markierung des viszeralen Mesoderms von wildtypischen Embryonen (*wt*, A) und unterschiedlichen Lamininmutanten (B-F') im Stadium 16 in Kombination mit Antikörperfärbungen gegen das ECM-Protein Nidogen/Entactin (NDG, grün). (G-I) Nachweis von sekretiertem Laminin (LAN, rot) in *wt* (G) und mutanten Embryonen (H-I). A-F entsprechen Dorsal-, G-I Ventralansichten. D', E', F' entsprechen Detailvergrößerungen aus D, E und F. (A) In der *wt* Situation ist der Mitteldarm von einer dünnen viszeralen Muskelschicht und einer NDG-positiven Basallamina umgeben. (B) Defekte im viszeralen Mesoderm und der ECM in *LanB2^{knod}*-Mutanten. (C) Phänokopie des *LanB2*-Phänotyps in *da-Gal4>LanB2RNAi*-Embryonen. (D, D') *Lan^{A9-32}*-mutante Embryonen sind durch eine wildtypische Mitteldarmmorphologie und eine charakteristische Fehlverteilung von NDG innerhalb der ECM gekennzeichnet. (E, E') Störungen in der Mitteldarmkammerung und lokale Anheftungsdefekte der NDG-positiven Basallamina von transheterozygoten *wb^{HG10}/Df wb*-Embryonen. (F, F') Doppelmutanten aus *Lan^{A9-32}* und *wb^{HG10}* phänokopieren die Defekte von *LanB2^{knod}*- und *da-Gal4>RNAiLanB2*-Embryonen. (G) Wildtypische Verteilung von sekretiertem Laminin um die inneren Organe. (H) Abwesenheit von sekretiertem Laminin in *LanB2^{knod}*-Mutanten. (I) LAN-Markierungen in den Hämozyten sowie im Entoderm und dem Fettkörper von *wb^{SF25}; Lan^{A9-32}*-Doppelmutanten.

5.3.13. Genetische Interaktionen von *LanB2* mit *Thrombospondin* und *kon-tiki* in der somatischen Muskulatur

Den bisherigen Analysen zur Folge spielt Laminin eine entscheidende Rolle beim Aufbau der extrazellulären Matrix und beeinflusst die Entwicklung von Geweben und Organen während der Embryogenese. Interessanterweise führen die charakterisierten Mutationen in Laminin zu teils drastischen Phänotypen in Herz, Tracheen und dem Mitteldarm. Die somatische Muskulatur ist dagegen nur marginal betroffen. Somit wäre es möglich, dass andere Faktoren in der ECM oder bestimmte Rezeptormoleküle im Muskel an der späten Muskeldifferenzierung beteiligt sind, die den Funktionsverlust von Laminin partiell kompensieren. Durch Literaturrecherchen konnten zwei potentielle genetische Interaktionspartner für *LamininB2* ermittelt werden. Das NG2 (Neuron-glia 2)/CSPG4 (Chondroitin sulfat proteoglycan 4)-homologe Kon-tiki (Kon, auch als Perdido bezeichnet), steht dabei stellvertretend für eine Reihe von Transmembranproteinen in der Muskulatur, die während dem Prozess der Muskelanheftung eine Rolle spielen. Interessanterweise zeigen homozygote *kon*-Embryonen, ähnlich wie *LanB2*-Mutanten, Lücken im somatischen Muskelmuster, die durch eine fehlerhafte Anheftung dieser Myotuben zustande kommen (Schnorrer et al., 2007; Estrada et al., 2007). Im Gegensatz zu *LanB2*-Mutanten sind diese Defekte allerdings ausschließlich auf die VL-Muskeln beschränkt, obgleich *kon* auch in anderen Muskelgruppen exprimiert ist (siehe Schnorrer et al., 2007). Über die phänotypische Ähnlichkeit hinaus bindet der Proteinanteil von NG2 *in vitro* an diverse Moleküle der extrazellulären Matrix, darunter auch an Laminin (Burg et al., 1996).

Für die Experimente zur genetischen Interaktion wurden *LanB2*², *LanB2*^{knod} sowie das Allel *kon*^{NP7048} verwendet, das auf eine P-Element Insertion in der Nähe des *kon*-Translationsstarts zurückzuführen ist (Flybase, 2005; DGRC, Kyoto stock Center). Als weitere Kontrolle wurde die genetische Interaktion zwischen beiden *LanB2*-Allelen und der Defizienz *Df(2L)BSC149* analysiert, die *kon* und 29 weitere, vorhergesagte Gen-Loci deletiert (Christensen und Cook, persönliche Mitteilung an Flybase; Flybase Datenbank, 2008).

Abbildung 5.19, nachfolgende Seite: Analyse der genetischen Interaktionen von *LamininB2* mit *kon-tiki* (*kon*) und *Thrombospondin* (*Tsp*). (A-H) β 3-Tubulin (β 3TUB, rot)-Markierung der somatischen Muskulatur von wildtypischen (*wt*, A) und mutanten Embryonen (B-H) im St 16/17. (A) Wildtypisches Muskelmuster (für detaillierte Angaben zur Nomenklatur siehe Appendix, Abb. A3). (B) Anheftungsdefekte in nahezu allen Muskeln von *kon*^{NP7048}; *LanB2*²-Doppelmutanten. (C) In *kon*^{NP7048}-Embryonen sind einzelne ventrale Longitudinal (VL)-Muskeln nicht angeheftet (Stern). (D) Der somatische Phänotyp von *kon*^{NP7048} kann durch das Einbringen einer Kopie *LanB2*² nicht verstärkt werden. (E) Auch in *LanB2*²-Mutanten fehlen einzelne VL-Muskeln (Stern). (F) Der somatische Phänotyp von *LanB2*² wird durch eine Kopie *kon*^{NP7048} deutlich verstärkt (Pfeile markieren unfusionierte Myoblasten). (G) Die Körpermuskulatur von *Tsp*^{D77}-Mutanten zeigt vor dem Schlupf nur marginale Defekte. (H) Starke Defekte im Muskelmuster von *Tsp*^{D77}; *LanB2*²-Doppelmutanten am Ende der Embryonalentwicklung.



Im Vergleich zur wildtypischen Situation (Abb. 5.19 A) weisen homozygote *kon*^{NP7048}-Embryonen den charakteristischen Anheftungsdefekt nur in einigen VL-Muskeln auf (Abb. 5.19 C, Stern), was vermuten lässt, dass es sich bei *kon*^{NP7048} um ein schwaches *kon*-Allel handelt. Im Hinblick auf die VL-Muskeln ist der beobachtete Phänotyp geringfügig stärker ausgeprägt als in *LanB2*-Mutanten (Abb. 5.19 E). In *kon*^{NP7048}; *LanB2*²-Doppelmutanten (Abb. 5.19 B) kommt es dagegen zu Anheftungsdefekten in allen VL-Muskeln sowie zahlreichen lateralen und dorsalen Muskeln. Auch die Reduzierung der *kon*-Dosis in *kon*^{NP7048}/+; *LanB2*² Embryonen führt zu einer deutlichen Verstärkung des Laminin-Phänotyps in allen Muskelgruppen (Abb. 5.19 F). Das Einkreuzen von einer Kopie *LanB2*² in *kon*^{NP7048}-mutante Embryonen induziert dagegen keine signifikanten Veränderungen des somatischen Phänotyps (Abb. 5.19 D). Auch in der genetischen Interaktion zwischen *LanB2*^{knod} und *kon*^{NP7048} können die entsprechenden morphologischen Effekte auf die somatische Muskulatur beobachtet werden (nicht gezeigt). Im Vergleich dazu sind diese charakteristischen Defekte in der somatischen Muskulatur von homozygoten *Df kon*-Embryonen sowie *Df kon*/+; *LanB2* und *Df kon*; *LanB2*-Mutanten deutlich stärker ausgeprägt (nicht gezeigt), was vermutlich auf den vollständigen Verlust von *kon* in der Defizienz zurückzuführen ist.

Als weiterer potentieller Interaktionspartner wurde das ECM-Protein Thrombospondin (*Tsp*) ausgewählt. Während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* ist *Tsp* ausschließlich in den Apodemen und den Pharynxmuskeln exprimiert (Adams et al., 2003; Chanana et al., 2007). Auch die Lokalisation des Proteins ist vor allem auf die extrazelluläre Matrix der Apodeme (tendon cell matrix) beschränkt, in der *Tsp* für die Aufrechterhaltung der Muskelanheftung benötigt wird (Chanana et al., 2007; Subramanian et al., 2007). In *Tsp*-Mutanten erfolgt zunächst die Anheftung der Muskeln an die Apodeme. Diese Verbindung bricht während der Schlupfbewegungen wieder auf, und die Myotuben runden sich ab (Chanana et al., 2007; Subramanian et al., 2007). Daher sind in *Tsp*-mutanten Embryonen im Stadium 15/16 zunächst nur marginale Defekte in einigen Muskeln zu erkennen (Abb. 5.19 G). In Doppelmutanten von *Tsp* und *LanB2* (Abb. 5.19 H) kommt es dagegen bereits in diesem Stadium zu schweren Defekten in den lateralen und dorsalen Muskelgruppen. Eine Dosisabhängigkeit der genetischen Interaktion konnte in diesem Fall nicht beobachtet werden.

6. Diskussion

Der larvale Mitteldarm von *Drosophila melanogaster* wird während der Embryonalentwicklung aus dem Entoderm, der viszeralen Muskulatur und der extrazellulären Matrix (ECM) gebildet. Im Anschluss an die Gastrulation besteht ein enger Kontakt zwischen den viszeralen Geweben, der für die weitere Differenzierung des Mitteldarms essentiell ist. So dient das viszerale Rumpfmesoderm als Substrat für die wandernden Entodermprimordien und die Gründerzellen der longitudinalen Muskulatur (Reuter et al., 1993; Tepass und Hartenstein, 1994; Georgias et al., 1997). Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die sich auf den „mesodermalen Aspekt“ der Mitteldarmentwicklung konzentrieren (Reuter et al., 1993; Tepass und Hartenstein, 1994; Reuter und Leptin, 1994; Azpiazu und Frasch, 1993; Weiss et al., 2001; Shirinian et al., 2007). Die möglichen Funktionen des Entoderms und der extrazellulären Matrix (ECM) sind dagegen kaum untersucht worden. Die Identifikation der viszeralen Mutationen *gurt* und *knod* als neue Allele des entodermalen Selektorgens *huckebein* (*hkb*) und des ECM-Moleküls *LamininB2* (*LanB2*) decken nun einen Einfluss des Entoderms und der ECM auf die Entwicklung der zirkulären viszeralen Muskulatur auf. Die Analyse dieser Einflüsse auf die viszerale Morphogenese von *Drosophila* ist das zentrale Thema dieser Arbeit.

Die viszeralen Anlagen entstehen im Embryo räumlich und zeitlich voneinander getrennt und kommen erst im voll verlängerten Keimstreif in direkten Kontakt. Deshalb könnte man einen entodermalen Einfluss auf die viszerale Myogenese erst ab diesem Zeitpunkt vermuten (Reuter und Leptin 1994; Tepass und Hartenstein, 1994; Wolfstetter et al., 2009). Die während dieser Arbeit erstmals durchgeführte morphologische Analyse der viszeralen Muskelentwicklung in *hkb*-Mutanten bestätigt diese Vermutung. So entwickeln sich die Anlagen des viszeralen Mesoderms auch in den Mutanten ohne offensichtliche Störungen und es kommt daraufhin zur korrekten Determination von Muskelgründerzellen und fusionskompetenten Myoblasten. Lediglich eine leichte Vergrößerung des Primordiums der longitudinalen viszeralen Muskelgründerzellen ist in *hkb^{gurt}*-Mutanten zu beobachten, was auf eine Transformation von Teilen der Entodermanlage zurückgeführt werden kann (Reuter und Leptin, 1994; Kusch und Reuter, 1999; Ismat et al., 2010). Interessanterweise ist dieser Effekt in *hkb^{gurt}*-Mutanten deutlich schwächer ausgeprägt als in den bislang beschriebenen *hkb*-Allelen (Kusch und Reuter, 1999; Ismat et al., 2010). Dies könnte im Zusammenhang mit der identifizierten Punktmutation stehen, die lediglich eine von drei potentiellen Zinkfinger-Domänen (Brönner et al., 1994) beeinflusst. Somit wäre es möglich, dass die in *hkb^{gurt}*

betroffene Domäne für die Aktivierung entodermspezifischer Zielgene essentiell ist, während die anderen, unveränderten Zn-Finger Motive eine vorrangige Rolle bei der Mesodermrepression spielen könnten.

Die nur leicht erhöhte Anzahl an longitudinalen Muskelgründerzellen in *hkb^{gurt}*-Mutanten ist dabei vor allem im Zusammenhang mit der durchgeführten Analyse zur viszeralen Muskelfusion relevant. So könnte ein partieller Fusionsdefekt in der zirkulären, viszeralen Muskulatur möglicherweise durch eine stark erhöhte Anzahl an longitudinalen Muskelgründerzellen kompensiert werden, falls diese noch in der Lage wären mit den FCMs des zirkulären viszeralen Mesoderms zu fusionieren.

Die genetische Regulation von Fusionsereignissen zwischen Muskelgründerzellen und fusionskompetenten Myoblasten während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* war vor allem im letzten Jahrzehnt Gegenstand intensiver Forschung. Die beteiligten Gene wurden dabei oft anhand der charakteristischen somatischen Muskelphänotypen von mutanten Embryonen identifiziert (Haralalka und Abmayr, 2010). Demgegenüber gestaltet sich die Suche nach Fusionsdefekten in der viszeralen Muskulatur weitaus schwieriger. So variieren die viszeralen Defekte in den bislang identifizierten und beschrieben „Muskelfusionsmutanten“ stark und sind mit Lücken oder Streckungsdefekten in den viszeralen Bändern, der Reduktion von Muskelgewebe, Unregelmäßigkeiten bei der Ausbildung des viszeralen Muskelnetzwerks oder dem Fehlen der ersten Mitteldarmkonstriktion assoziiert (Bour et al., 2000; Ruiz-Gomez et al., 2000; San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002; Schröter et al., 2006). Gerade die detaillierten Analysen von Klapper et al. (2002) verdeutlichen, dass sogar unfusionierte viszerale Muskelgründerzellen in der Lage sind, einen netzartigen Verbund um den Mitteldarm auszubilden. Innerhalb solcher Strukturen lässt sich mit Hilfe konventioneller Marker keine eindeutige Aussage über den tatsächlichen „Fusionszustand“ einzelner Myotuben treffen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit dem *bagpipe-lacZ*-Reporter bieten eine interessante Alternative zu den bisherigen Analysen. So markiert *bap-lacZ* spezifisch alle Zellen des viszeralen Rumpfmesoderms, wobei der Reporter bis zum Ende der Embryogenese nachweisbar ist (Azpiazu und Frasch, 1993). Somit ist es möglich, unfusionierte viszerale Myoblasten auch außerhalb der viszeralen Muskulatur eindeutig zu markieren. Mit Hilfe dieses Reporters konnten auch in *bap-lacZ; hkb^{gurt}*-mutanten Embryonen keine unfusionierten Myoblasten identifiziert werden, wie beispielsweise in *jeb*- und *ALK*-Mutanten (Stute et al., 2004), was einen direkten Einfluss des Entoderms auf den Muskelfusionsprozess ausschließen würde.

Diese Erkenntnis ist dabei von besonderem Interesse, da für die frühere Determination der viszeralen Muskelgründerzellen der Einfluss eines benachbarten Gewebes (i.e. des somatischen Mesoderms) entscheidend ist (Englund et al., 2003; Lee et al., 2003; Stute et al., 2004). Interessanterweise erleichterte der, durch den Verlust des Entoderms induzierte, Differenzierungsstop in der viszeralen Muskulatur von *hkb*-mutanten Embryonen auch die Analyse von potentiellen Fusionsdefekten innerhalb der viszeralen Bänder. So konnten die stark verkürzten Myotuben der viszeralen Muskulatur relativ einfach als ein- bzw. zweikernig erkannt werden. Die morphologische Analyse des viszeralen Mesoderms von bekannten und potentiellen Fusionsmutanten unter Verwendung des *bap-lacZ*-Reporters könnte somit durch die zusätzliche Ablation des Entoderms oder das Einkreuzen der entsprechenden Mutation in einen *hkb^{gurt}*-mutanten Hintergrund verbessert werden.

Die hier durchgeführten Analysen belegen überdies, dass auch die Fusionen der longitudinalen Gründerzellen (FCs) aus dem caudalen viszeralem Mesoderm (CVM) mit den fusionskompetenten Myoblasten (FCMs) des viszeralem Rumpfmesoderms in *hkb^{gurt}*-Mutanten erfolgreich stattfinden. Auch die Migration der longitudinalen Muskulatur auf den viszeralem Bändern erfolgt ohne offensichtliche Störungen, was auf die Unabhängigkeit dieser Prozesse von der Entodermentwicklung hindeutet.

Dem gegenüber beeinflusst der Verlust des Entoderms in mutanten *hkb*-, *srp*- und *fkh*-Embryonen sowie die spezifische Ablation der Mitteldarmprimordien (Wolfstetter et al., 2009) die dorso-ventrale Streckung der viszeralem Muskulatur, welche bis zum Ende der Embryogenese die Form zweier schmaler Bänder beibehält. Die Verdoppelung von ektodermalen Enddarmstrukturen in mutanten *srp*-Embryonen (Reuter, 1994) oder die Transformation von Vorder- und Enddarm in *fkh*-Mutanten (Weigel et al., 1989) hat dagegen keinen bedeutenden Einfluss auf die Ausprägung dieses Mitteldarmphänotyps. Die Annahme, dass sich die Mitteldarmmuskulatur weitestgehend unabhängig von Vorder- und Enddarm entwickelt, wird weiter durch die Analysen an *byn*-defizienten und *tll*-mutanten Embryonen bekräftigt. So ist das viszerale Rumpfmesoderm in beiden Fällen zu einer dünnen Muskelschicht um das Entoderm differenziert. Auch die Analysen von San Martin und Bate (2001) zeigen, dass die Ablation des ektodermalen Enddarms lediglich die Spezifizierung und Differenzierung des posteriorsten Teils der zirkulären Muskulatur (das so genannte Hindgut Visceral Mesoderm oder HVM) beeinflusst. Interessanterweise hat die Entwicklung des HVM dagegen keinen Einfluss auf die Differenzierung eines Enddarms. Insgesamt entsteht der

Eindruck, dass es innerhalb der einzelnen Darmabschnitte zu unabhängigen Interaktionen zwischen der viszeralen Muskulatur und den darunter liegenden Darmzellen kommt, welche die Entwicklung der viszeralen Muskulatur somit auch regional unterschiedlich beeinflussen könnten. Im Falle der Mitteldarmentwicklung konnte die gegenwärtige Vorstellung von den beteiligten Differenzierungsmechanismen aufgrund der durchgeführten Analysen entscheidend erweitert werden. So beeinflusst die viszerale Muskulatur zunächst die Wanderung und Epithelialisierung der Entodermzellen (Reuter et al., 1993; Tepass und Hartenstein, 1994). Diese sind kurz darauf für die Streckungsbewegung der viszeralen Myotuben essentiell. Ob die Muskeln dabei das Entoderm als „passives“ Substrat nutzen oder auf Signale aus den entsprechenden Zellen reagieren, konnte im Zuge dieser Analysen nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings weisen die morphologischen Analysen an den, ebenfalls während dieser Arbeit charakterisierten, *LanB2*-Mutanten darauf hin, dass der Streckungsprozess im gewissen Maße an die ECM zwischen den viszeralen Geweben gebunden ist. Möglicherweise ist auch die, ebenfalls in *LanB2*-Mutanten gestörte, Ausbildung des Mitteldarmepithels, für die korrekte Sekretion der „viszeralen ECM“ entscheidend. Eine morphologische Analyse von *DE-Cadherin* Mutanten, in denen die Adhäsion und Epithelialisierung von Entodermzellen gestört ist (Tepass und Hartenstein, 1994) könnte hier möglicherweise weitere Anhaltspunkte liefern.

Auch sind die zellulären Mechanismen, welche die Interaktionen zwischen Entoderm und viszeraler Muskulatur vermitteln noch weitestgehend unbekannt. So berichten Schröter et al. (2006) von Streckungsdefekten in der viszeralen Muskulatur von homozygot-mutanten *blown fuse (blow)*- und *Hem/kette/Nap1(kette)*-Embryonen. Im *Drosophila*-Genom kodieren *blow* und *kette* für Proteine, welche die Aktivität von WASP und SCAR/WAVE modulieren (Bogdan und Klämbt, 2003; Jin et al., 2011). WASP und SCAR/WAVE gelten ihrerseits als entscheidende Regulatoren der ARP2/3-basierten Aktin-Polymerisation (Millard et al., 2004). Somit könnte auch die Streckungsbewegung in den viszeralen Myotuben von *hkb*-mutanten Embryonen mit einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts verbunden sein. Wie die Aktivität von entodermalen Transkriptionsfaktoren wie HKB während der frühen Embryonalentwicklung auf die spätere Reorganisation des Aktinzytoskeletts in den viszeralen Myotuben einwirken könnte, bleibt dennoch ungeklärt. Eine Erklärung könnte die Entschlüsselung potentieller Signalwege zwischen Entoderm und viszeraler Muskulatur liefern. Vor allem die Auswirkungen von Signalen aus dem Entoderm in der viszeralen Muskulatur wären im Hinblick auf diesen Aspekt der viszeralen Entwicklung interessant.

Vielversprechende Kandidaten für solch einen Signalweg stellen die Midkine/Pleiotrophin-homologen Zytokine Miple und Miple2 dar, die unter anderem im Entoderm exprimiert werden. Beide gelten als potentielle Liganden für den ALK-Rezeptor, für n-Syndecan und für bestimmte Integrin-Dimere, deren Expression im viszeralem Mesoderm von *Drosophila* bereits nachgewiesen wurde oder als wahrscheinlich gilt (Spring et al., 1994; Loren et al., 2001; Englund et al., 2006). Bisher wurden allerdings noch keine spezifischen *miple*-Mutanten erzeugt oder beschrieben, noch konnten alternative Signalwege identifiziert werden, die einen Einfluss auf die viszerale Muskeldifferenzierung haben.

Die durchgeführten Analysen legen nahe, dass neben dem Entoderm auch die extrazelluläre Matrix der viszeralen Gewebe eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Differenzierung des Mitteldarms darstellt. So konnte der, in dieser Arbeit identifizierte und beschriebene, „knödel-Phänotyp“ einer Mutation im *LamininB2* (*LanB2*)-Gen zugeordnet werden. Laminine sind ein ubiquitärer Hauptbestandteil in den Basallaminae tierischer Organismen. Im *Drosophila* Genom kodieren vier Gene für zwei α (*LanA* und *Wb*)-, eine β (*LanB1*)- und eine γ (*LanB2*)-Laminin Untereinheit. Nach dem derzeitigen Modell lagern sich diese Untereinheiten zu zwei unterschiedlichen Heterotrimeren zusammen. Dabei bilden zunächst eine *LanB1*- und eine *LanB2*-Kette ein stabiles Dimer aus, in das daraufhin entweder die *LanA*- oder die *Wb*-Untereinheit eingelagert wird (Fessler und Fessler, 1989; Montell und Goodman, 1989; Kusche-Gullberg et al., 1992; Kumagai et al., 1997; Martin et al., 1999). Innerhalb des extrazellulären Raums interagieren die sekretierten Laminintrimere mit zahlreichen, unterschiedlichen Molekülklassen. Aufgrund der Fähigkeit zu supramolekularen Netzwerken zu polymerisieren, gilt Laminin auch als entscheidender Faktor beim Aufbau von ECM-Strukturen wie den Basallaminae (Yurchenco et al., 1992). Es wird außerdem angenommen, dass sich eine Basallamina aus polymeren Laminin- und Kollagen IV-Netzwerken zusammensetzt, die miteinander durch Nidogen (NDG) und andere ECM Komponenten verknüpft sind (Timpl und Brown, 1996). Die hier durchgeführten Analysen bestätigen diese Vorstellung, da Laminin, NDG und auch Kollagen IV in diskreten Schichten innerhalb der viszeralen Basallaminae von *Drosophila* nachgewiesen werden können. Die Beobachtung, dass NDG, Kollagen IV und weitere ECM-Moleküle in *LanB2*-Mutanten fehllokalisiert sind und keine durchgängigen Schichten ausbilden, weist auf eine zentrale Bedeutung von Laminin beim Aufbau der Basallamina hin. Dies wird durch Analysen an embryonalen Stammzellaggregaten (so genannten „Embroid Bodies“) weiter bestätigt, die zeigen, dass vor allem die Polymerisierung von Laminin-Netzwerken und deren Verankerung

an der Zelloberfläche für die Entstehung einer strukturell- und funktionell-intakten Basallamina entscheidend sind (Li et al., 2002). Die hier vorgestellten Studien belegen somit das große Potential von *Drosophila*-Embryonen als geeignetes *in vivo*-System zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen ECM-Molekülen und der strukturellen Organisation einer Basallamina.

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits Verlustmutationen in den beiden α -Laminin Genen identifiziert worden, jedoch nicht in *LanB1* und *LanB2*. Weil die starke Expression von Laminin im Bereich der viszeralen Basallamina bereits zu Spekulationen über die Beteiligung der ECM an der Mitteldarmdifferenzierung geführt hatte, wurden *LanA*- und *wb*-Mutanten auch im Hinblick auf ihre viszerale Morphologie untersucht (Henchcliffe et al., 1993; Yarnitzky und Volk, 1995; Martin et al., 1999). So konnte im Zuge der damaligen Arbeiten gezeigt werden, dass *LanA*-Mutanten trotz Störungen bei der initialen Polarisierung des Mitteldarmepithels am Ende der Embryonalentwicklung einen wildtypisch differenzierten Mitteldarm ausbilden (Yarnitzky und Volk, 1995). In *wb*-mutanten Embryonen wurden keine Defekte während der Darmentwicklung festgestellt (Martin et al., 1999). Die Identifikation von *LanB2*-Allelen anhand ihres charakteristischen viszeralen Phänotyps offenbart dagegen entscheidende Einflüsse von Laminin auf die Differenzierung von Entoderm und viszeraler Muskulatur. Vergleichbare viszerale Defekte lassen sich durch *LanB2*-RNA-Interferenz hervorrufen und sind darüber hinaus in *LanB1*-Mutanten ausgeprägt, die vor kurzem von Urbano et al. (2009) beschrieben wurden. Durch die vergleichende Analyse der viszeralen Morphologie von *LanA*-, *wb*- und *LanB2*-Embryonen sowie den erstmals analysierten *wb*; *LanA*-Doppelmutanten, konnte zunächst ein leichter Kammerungsdefekt in mutanten *wb*-Embryonen festgestellt werden, der in der früheren Analyse nicht erfasst worden war. Darüber hinaus deutet die drastische Verstärkung des viszeralen Phänotyps, sowohl in *LanB2*-Embryonen als auch in *wb*; *LanA*-Doppelmutanten, auf die Redundanz beider Laminin Trimere während der viszeralen Differenzierung hin. Diese Analysen schaffen somit eine plausible Erklärung für die unerwartet schwachen morphologischen Konsequenzen von *LanA*- und *wb*-Einzelmutationen und liefern gleichzeitig einen entscheidenden Beweis für das Modell der zwei Laminintrimere.

Interessanterweise scheint die Ausbildung einer Basallamina für die viszerale Differenzierung nicht zwingend erforderlich zu sein, da in *LanA*-mutanten Embryonen drastische Störungen im Aufbau der Basallamina und gleichzeitig ein wildtypisch gekammerter Mitteldarm beobachtet werden können (Yarnitzki und Volk, 1995; Prokop et al., 1998). Dagegen weisen mutante *wb*-Embryonen eine augenscheinlich intakte Basallamina um die inneren Organe auf, zeigen allerdings lokale Adhäsionsdefekte zwischen den viszeralen Geweben sowie Störungen bei der Kammerung des Mitteldarms. Dieser Befund verdeutlicht, dass den beiden Laminintrimeren trotz ihrer redundanten Funktion während der Mitteldarmentwicklung wahrscheinlich auch individuelle Rollen beim Zusammenhalt der viszeralen Gewebe und beim Aufbau der Basallamina zukommen. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass die einzelnen Laminintrimere auch unabhängig vom Aufbau einer Basallamina agieren könnten. Zudem ist nicht auszuschließen, dass Integrine während der viszeralen Entwicklung auch direkt an Liganden und Rezeptoren auf benachbarten Zelloberflächen binden und somit unabhängig von der ECM wirken könnten.

Durch die detaillierte Analyse des viszeralen Phänotyps von *LanB2*-Mutanten konnte eine Rolle von Laminin während der Wanderung, Verteilung und Epithelialisierung der Entodermzellen aufgedeckt werden. Vergleichbare Phänotypen wurden auch in mutanten Embryonen beobachtet, in denen einzelne Integrindimere nicht mehr gebildet werden. So führen bestimmte Mutationen in *multiple edematous wings* (α PS1-Integrin), *inflated* (α PS2), und *scab* (α PS3) zu Störungen während der entodermalen Zellmigration oder rufen Defekte in der viszeralen Muskulatur hervor (Martin-Bermudo et al., 1998). Auch *mysospheroid* (β PS); β v-Integrin-Doppelmutanten (Devenport und Brown, 2004) weisen einen charakteristischen viszeralen Phänotyp auf, der große Ähnlichkeit zu den Mitteldarmdefekten von *LanB2*-Mutanten besitzt. Auch die beobachteten Defekte während der Differenzierung von Magenblindsäcken und Cardia könnten auf eine gestörte Interaktion von Laminin und Integrin hindeuten, da vergleichbare Phänotypen bereits für *mysospheroid*- und *inflated*-Mutanten beschrieben wurden (Pankratz und Hoch, 1995; Brown et al., 2000). Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion zwischen dem PS1-Integrin-Heterodimer und dem LamininA-Trimer sowie PS2-Integrin und LamininW in *Drosophila*-Zellkulturen nachgewiesen werden (Gotwals et al., 1994; Graner et al., 1998). Die große phänotypische Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Integrin- und den hier untersuchten *LanB2*-Mutanten könnte somit ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Wechselwirkungen zwischen Lamininen und Integrinrezeptoren

eine essentielle molekulare Voraussetzung für die organisierten Interaktionen zwischen den viszeralen Geweben darstellen.

Ein weiteres Merkmal des *LanB2*-Mitteldarmphänotyps sind die Differenzierungsstörungen in der viszeralen Muskulatur. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide viszerale Muskelschichten betroffen sind. In der zirkulären viszeralen Muskulatur beeinflusst der Verlust von *LanB2* die Orientierung der Myotuben und reduziert deren dorso-ventrales Streckungswachstum. Diese Defekte sind am stärksten in jenen Regionen ausgeprägt, in denen sich Lücken im darunter liegenden Entoderm befinden. In diesen Bereichen ähneln die Differenzierungsstörungen in der zirkulären viszeralen Muskulatur stellenweise denen von *hkb*-Embryonen, in denen das Entoderm nicht determiniert ist (Wolfstetter et al., 2009). Bereiche mit kleineren Löchern im Entoderm von *LanB2*-mutanten Embryonen können dagegen von einzelnen zirkulären Myotuben überbrückt werden. Somit würden diese Befunde die entscheidende Rolle des Entoderms als Substrat für die sich streckenden viszeralen Myotuben weiter hervorheben. Die Ausbildung von filamentösen Fortsätzen in der viszeralen Muskulatur und deren, vor allem in *LanB2*-mutanten Embryonen auffällige, Ausrichtung zur ECM deuten allerdings auf eine komplexere Rolle von Laminin während der viszeralen Muskelstreckung hin. So beeinflusst Laminin in Zellkultur und *in vivo* das Auswachsen und die Orientierung von Neuriten (Luckenbill-Edds, 1997). Die Reduzierung des Streckungswachstums in der viszeralen Muskulatur von *LanB2*-Mutanten könnte möglicherweise auf einen vergleichbaren Effekt von Laminin während der viszeralen Muskelstreckung hindeuten. Neben einer direkten Beteiligung von Laminin-Molekülen an diesen Vorgängen könnten auch die supramolekularen Laminin-Netzwerke innerhalb der ECM die Verankerung von bestimmten „Orientierungspunkten“ für die viszeralen Myotuben ermöglichen oder als Reservoir für sekretierte Signalmoleküle dienen. Die Ausrichtung der viszeralen Myotuben zu den ECM-Überresten in *LanB2*-Mutanten könnte auch auf die Beteiligung anderer, ECM-assoziiierter Faktoren an diesem Prozess hindeuten. Diese Faktoren könnten möglicherweise mit Hilfe von genetischen Interaktionsexperimenten identifiziert werden, die im Zuge dieser Arbeit bereits einen Einfluss von Laminin auf die somatische Muskelanheftung offenbarten. Dabei würde die, für diese Arbeit, verwendete Modifikation des experimentellen Designs (siehe 4.11.2) auch die Durchmusterung von Mutanten- oder Defizienzen-Kollektionen nach genetischen Interaktionspartnern für Laminin und andere ECM-Komponenten im größeren Maßstab ermöglichen.

Die durchgeführten Analysen weisen auch auf eine Rolle von Laminin während der Migration und Differenzierung der longitudinalen viszeralen Muskulatur hin. So ist die Anzahl der longitudinalen Muskeln, welche die anteriore Hälfte des prospektiven Mitteldarms erreichen, in *LanB2*-Mutanten reduziert. Da wandernde Zellen oft die extrazelluläre Matrix als Substrat nutzen, wäre es denkbar, dass auch die Adhäsion und Migration der longitudinalen Muskelzellen von einer intakten ECM abhängt. Die Tatsache, dass die longitudinalen Gründerzellen bereits an den zirkulären Muskelbändern anheften und auf diesen zu wandern beginnen, bevor ECM-Schichten um diese Gewebe nachgewiesen werden können, steht allerdings im klaren Widerspruch zu dieser Annahme (Fessler und Fessler, 1989; Tepass und Hartenstein, 1994; Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999). Möglicherweise könnte die hier durchgeführte, vergleichend-morphologische Analyse von wildtypischen Embryonen und *LanB2*-Mutanten Aufschluss über die Rolle der ECM während der Wanderung der viszeralen longitudinalen Muskulatur geben. So spalten sich die longitudinalen Muskelzellen während der *wt*-Entwicklung entlang zweier Hauptwanderwegen an den Rändern der zirkulären Muskulatur auf (Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999; Klapper, 2000). Im Zuge dieser Arbeit konnte dabei erstmals gezeigt werden, dass sie dabei zunehmend von der ECM umschlossen werden. Daher könnte man eine Verbindung zwischen dieser gerichteten Zellmigration und der ECM vermuten. Interessanterweise sind auch die meisten longitudinalen Muskelzellen von *LanB2*-Mutanten nicht mehr von der ECM umgeben. Zudem verlassen auffallend viele dieser Zellen ihre vorgesehenen Wanderwege, obgleich der enge Kontakt zur zirkulären Muskulatur beibehalten wird. Demnach könnte die Funktion von Laminin oder einer intakten ECM darin bestehen, Orientierungspunkte für die wandernden Muskelzellen bereitzustellen. Auch könnte die ECM als Reservoir für die, vom viszeralen Mesoderm, sekretierten FGFR (Akronym für den Fibroblast Growth Factor Receptor)-Liganden Pyramus und Thispe fungieren, deren Einfluss auf die Wanderung der longitudinalen Muskulatur erst kürzlich von Kadam et al. (2012) beschrieben wurde. Die hier vorgestellten Ergebnisse decken somit erstmals den Einfluss von Laminin auf koordinierte Wanderungs- und Streckungsbewegungen bestimmter Zelltypen in *Drosophila* auf und könnten in Zukunft eine interessante Alternative zu den bisherigen, zumeist *in vitro* durchgeführten, Analysen zur Zellmotilität darstellen.

Darüber hinaus könnte auch die, in der longitudinalen Muskulatur von *LanB2*-Mutanten, beobachtete Veränderung der Zellform im Zusammenhang mit einer gestörten Zellmotilität stehen. So regulieren Rho (Ras Homologous)-GTPasen der Ras (Rat Sarcoma)-Proteinsuperfamilie und deren Effektoren den Auf- und Abbau von Aktomyosin (auch als „Stressfasern“ bezeichnet) im Zytoskelett, was die Migrationseigenschaft von Zellen beeinflusst und zur Veränderung der Zellform führen kann (Narumiya et al., 2009). Da Aktomyosin zudem die Funktion von Integrinrezeptoren innerhalb der Adhäsionsplaques (Focal Adhesions) moduliert, besteht ein potentieller Zusammenhang zwischen Zell-Matrix-Interaktionen und der intrazellulären Aktivität von Rho-GTPasen (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Gilmore und Burrige, 1996). Bemerkenswerterweise nehmen nach dem Keimstreifrückzug in *LanB2*-Mutanten auch nur diejenigen longitudinalen Muskelzellen eine abgeflachte, längliche Form an, die in direktem Kontakt zu den ECM-Überresten stehen. Die übrigen Zellen behalten dagegen eine rundliche Morphologie bei, was möglicherweise auf Störungen während der Reorganisation des Zytoskeletts hindeuten könnte. Coisy-Quivy et al. (2006) konnten den Einfluss dominant-negativer Formen bestimmter Rho-GTPasen auf die Myofibrillen-Differenzierung in der Schwanzmuskulatur von *Ciona*-Larven nachweisen. Somit könnten Rho-GTPasen möglicherweise auch auf die terminale Differenzierung der longitudinalen viszeralen Muskulatur von *Drosophila* einwirken. Die Analyse von potentiellen Funktionen der Rho-GTPasen und deren Effektoren im Hinblick auf die ECM und die Entwicklung der longitudinalen Muskulatur stellt somit ein interessantes Thema für zukünftige Forschungen dar.

Aufgrund der auffallend starken Expression von Laminin im Bereich der Apodeme sowie der schwachen Adhäsionsdefekte in der somatischen Muskulatur mutanter *LanB2*-Embryonen wurde eine Beteiligung von Laminin an der Etablierung oder Aufrechterhaltung von Muskelanheftungsstellen angenommen. Die daraufhin durchgeführten Experimente zum Nachweis der genetischen Interaktion offenbaren *kon-tiki* und *Thrombospondin* als potentielle Interaktionspartner von Laminin während der Muskeladhäsion. Das Transmembranprotein Kon-Tiki weist eine große Ähnlichkeit zu Proteinen aus der NG2 (Neuron-glia 2)/CSPG4 (Chondroitin sulfate proteoglycan 4)-Familie auf, verfügt allerdings nicht über die, für NG2 charakteristische, Chondroitin-Sulfat-Modifikation (Schnorrer et al., 2007). *In vitro*-Analysen von Burg et al. (1996) legen nahe, dass Laminin mit dem Chondroitinase-behandeltem NG2-Proteinkern interagiert. Ein ähnliches Szenario wäre demnach auch für Laminin und Kon-Tiki während der embryonalen Myogenese von *Drosophila* vorstellbar. Dagegen sprechen

Befunde von Tillet et al. (2002), die zeigen, dass sich NG2-transfizierte Zellen nicht auf Laminin beschichteten Oberflächen ausbreiten. Demnach könnte die beobachtete Verstärkung des somatischen *LanB2*-Phänotyps durch die Reduzierung der *kon-tiki* Dosis auch auf eine indirekte Verbindung zwischen diesen Faktoren hindeuten. So konnten Estrada et al. (2007) bereits die genetische Interaktion zwischen *multiple edematous wings* (α PS1-Integrin) und *perdido* (Estrada et al. beschrieben das von Schnorrer et al. identifizierte *kon-tiki* als *perdido*) in der somatischen Muskulatur von *Drosophila*-Embryonen nachweisen. Es bleibt folglich zu klären, ob der beobachteten Verstärkung des somatischen Phänotyps eine direkte Interaktion zwischen Kon und Laminin zugrunde liegt, oder ob Interaktionen zwischen Laminin und Integrinen eine permissive Rolle für die Funktion von Kon bei der somatischen Muskelanheftung übernehmen.

Im Gegensatz zu Kon, dessen Funktion während einer frühen Phase des Anheftungsprozesses vermutet wird (Schnorrer et al., 2007), ist das ECM-Molekül Thrombospondin essentiell für die Aufrechterhaltung der Muskelanheftung während der Larvalentwicklung (Subramanian et al., 2007; Chanana et al., 2007). So entwickeln sich *TSP*-mutante Embryonen bis zum Ende der Embryogenese weitestgehend wildtypisch. Erst durch die Muskelkontraktionen während des Schlupfvorgangs kommt es zur Ablösung der somatischen Myotuben von den Apodemen (Chanana et al., 2007). Interessanterweise können in *TSP*; *LanB2*-Doppelmutanten bereits vor dem Schlupf schwere Muskeldefekte nachgewiesen werden. Auch sind nun vermehrt die dorsalen Muskelgruppen betroffen, die in *TSP*-Mutanten weniger starke Defekte aufweisen (Chanana et al., 2007). Eine Erklärung hierfür könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der ECM um bestimmte Gewebe und Organe liegen. So werden *TSP*-Transkripte und das pentamere Protein vor allem in den Apodemen und der ECM um die Muskelanheftungsstellen exprimiert (Adams et al., 2003; Subramanian et al., 2007). Der Verlust von ubiquitär verteilten ECM-Molekülen wie Laminin könnte demnach in den entsprechenden Matrices durch regional exprimierte Faktoren, wie TSP, partiell kompensiert werden. Auf der anderen Seite stellen supramolekulare Laminin-Netzwerke eine entscheidende Voraussetzung für die Einlagerung und Lokalisation von weiteren ECM-Komponenten dar (Colognato und Yurchenco, 2000), was sich auch in der Fehlverteilung von ECM-Molekülen in *LanB2*- (diese Arbeit) und *LanB1*-Mutanten (Urbano et al., 2009) widerspiegelt. Dies könnte somit die Funktion von regional exprimierten ECM-Molekülen, wie zum Beispiel TSP, entscheidend beeinflussen. Hinweise für solche Szenarien finden sich häufig in der morphologischen Analyse von Laminin Mutanten. So weisen die analysierten *LanB2*-mutanten Larven einen Tracheenphänotyp auf, der in ähnlicher Weise auch für

serpentine (*serp*)- und *vermiform* (*verm*)-Mutanten charakteristisch ist, wobei *serp* und *verm* für Chitin-modifizierende Proteine der Tracheenmatrix kodieren (Luschnig et al., 2006). Auch Yi et al. (2008) beschreiben Adhäsionsdefekte zwischen Pericardialzellen und Cardioblasten aufgrund des RNAi-induzierten *knock-downs* des Kollagen IV-ähnlichen ECM-Moleküls Pericardin (PRC). Da durch die morphologische Analyse von *LanB2*-Mutanten auch die Fehllokalisierung von PRC sowie Adhäsionsdefekte zwischen den Herzzellen aufgedeckt wurden, könnte der Phänotyp sowohl mit einer spezifischen Lamininfunktion als auch mit einem indirekten Einfluss auf die Rolle von PRC in Verbindung gebracht werden. Diese Beispiele verdeutlichen, dass es nicht immer möglich ist, die beobachteten Phänotypen auf den direkten oder indirekten Einfluss von Laminin zurückzuführen. Andererseits ermöglicht die Analyse von genetischen Interaktionen mit den hier analysierten Lamininmutanten die Identifizierung von regionalen Unterschieden in der ECM-Zusammensetzung und die Entschlüsselung weiterer, ECM-abhängiger Entwicklungsprozesse.

Die morphologische Analyse von *LanB2*-, *LanB1*- sowie *LanA*- und *wb*-Mutanten offenbart vor allem einen großen Einfluss von Laminin auf die spätembryonale Organ- und Gewebsdifferenzierung sowie die Migrations- und Adhäsionseigenschaften von Zellen (Yarnitzki und Volk, 1995; Martin et al., 1999; Urbano et al., 2009). Demgegenüber deuten Analysen an Mausembryonen und „Embroid Bodies“ darauf hin, dass Laminin bereits während der Gastrulation und vor der Einnistung des Embryos eine entscheidende Rolle spielen könnte (Smyth et al., 1999; Miner et al., 2004; Miner und Yurchenko, 2004). Im Unterschied zur Mausentwicklung werden die ersten Mitosen in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* nicht von Zellteilungen begleitet. Bis zur Zellularisierung des Blastoderms ist der Perivitellinraum somit der einzig mögliche extrazelluläre Raum, in dem eine Matrix ausgebildet sein könnte. Darüber hinaus könnten maternale ECM-Komponenten auch innerhalb der Zygote lokalisiert sein. Fessler und Fessler (1989) berichten vom Nachweis geringer Mengen an ECM-Proteinen in Oozyten und 0-2 h alten Embryonen, welche Funktion diese ECM-Proteine haben könnten, ist allerdings noch gänzlich ungeklärt. So benutzten Garzino et al. (1989) den monoklonalen Antikörper RD3 zum Nachweis von LamininA und einem unbekanntem 240 kDa Antigen. In den durchgeführten Experimenten konnte das LanA-Protein erst nach 6-8 Stunden nachgewiesen werden, das 240 kDa Antigen ist dagegen bereits vor der Zellularisierung vorhanden und akkumuliert später zwischen den Blastodermzellen. Garzino et al. (1989) räumen eine mögliche Beteiligung dieses Antigens an der Zellularisierung, den frühen Zell-Matrix-Interaktionen und der Bildung einer ersten

Basallamina während der Trennung der Keimblätter ein. Auch Kollagen IV, das in den Follikelzellen translatiert und in die Oozyte eingelagert wird, ist im zellulären Blastoderm und während der Gastrulation ähnlich verteilt wie das 240 kDa Antigen (Knibiehler et al. 1990). Darüber hinaus deutet die spezifische Expression der ECM-Komponente Papilin entlang der Invaginationsbereiche im gastrulierenden Embryo sowie der Nachweis des Dystroglycan-Rezeptors im Blastodermstadium auf eine Beteiligung der ECM an der *Drosophila*-Frühentwicklung hin (Kramerowa et al., 2000; Schneider und Baumgartner, 2008). Demgegenüber konnte die Expression von *LanA*, *LanB1* und *LanB2* weder im Blastoderm noch während der Gastrulation nachgewiesen werden (Garzino et al., 1989; Montell und Goodman, 1989; Kusche-Gullberg et al., 1992). Lediglich *wingblister*-Transkripte sind bereits in den Nährzellen und der Oozyte vorhanden, was auf eine maternale Komponente dieser Laminin α -Untereinheit hindeutet (Martin et al., 1999). Somit wäre die Existenz einer spezialisierten ECM während der Frühentwicklung im Embryo denkbar, die sich weitestgehend ohne den Einfluss von Laminin ausbilden würde. Die Beteiligung von, üblicherweise Basallamina-assoziierten, Kollagen IV-Molekülen an solchen ECM-Strukturen erscheint ungewöhnlich, könnte aber im Zusammenhang mit der Abwesenheit von fibrillären Kollagentypen und Fibronectin bei *Drosophila* stehen (Broadie et al., 2011). Die Analyse von derart spezialisierten ECM-Strukturen könnte somit unser Verständnis des Zusammenhangs zwischen Aufbau und Funktionsweise der ECM entscheidend verbessern.

Auch die Rolle einer maternalen Komponente von *wingblister* (*wb*) während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* ist bislang noch nicht verstanden. Im Unterschied zu den anderen Laminin-Untereinheiten weist Wb eine charakteristische RGD-Aminosäuresequenz auf, weshalb seine Rolle bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion vermutet wird (Martin et al., 1999). RGD-Motive spielen bei der Fibronectin-abhängigen Gastrulation des Mesoderms von *Xenopus laevis* eine entscheidende Rolle (Winklbauer et al., 1996) und beeinflussen auch die Migrationseigenschaften der primären Mesenchymzellen von Seeigeln (Katow und Hayashi, 1985; Katow et al., 1990). Da die Existenz eines postulierten *Drosophila*-Fibronectins (Gratecos et al., 1988) bislang nicht bestätigt werden konnte, stehen nun Wb und andere ECM-Moleküle mit RGD-Sequenzen in einem besonderen Forschungsfokus.

Der früheste Phänotyp, der mit Mutationen in *wingblister* assoziiert wird, ist ein transientser Keimstreifrückzugsdefekt (Martin et al., 1999). Schöck und Perrimon (2003) beschreiben lediglich eine Verstärkung dieses Phänotyps aufgrund des Verlusts der maternalen und

zygotischen Komponente von *wb*. Demnach wäre es unwahrscheinlich, dass *wb* bereits vor diesem Zeitpunkt einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung hat. Im weiteren Verlauf der Embryogenese wird eine spezifische Analyse der maternalen *wb*-Komponente durch die zygotische Expression aller Laminin Untereinheiten deutlich erschwert. Aufgrund der beginnenden Sekretion von Laminintrimeren im voll verlängerten Keimstreif lässt sich zudem nicht eindeutig klären, ob Wb-Untereinheiten alleine oder nur als Teil eines Laminintrimers funktionell aktiv sind. Die in dieser Arbeit durchgeführten morphologischen Analysen an *wb*; *LanA*-Doppelmutanten und *LanB2*-mutanten Embryonen könnten darüber Aufschluss geben. So weisen *LanB2*-mutante Embryonen Störungen bei der Nidogen-Verteilung innerhalb der ECM auf, wohingegen in *wb*; *LanA*-Doppelmutanten ein etwas abgemilderter Phänotyp ausgebildet ist, der stellenweise an die ECM-Morphologie von *LanA*-Mutanten erinnert. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die Bildung von stabilen LanB1/LanB2-Dimeren, die auch in der Abwesenheit von α -Untereinheiten entstehen können (Kumagai et al., 1997). Die Bildung von stabilen Dimeren ist ein essentieller Zwischenschritt beim Zusammenbau von Laminintrimeren (Beck, 1990; Kumagai et al., 1997) und würde in den Doppelmutanten zur Einlagerung der maternalen Wb-Untereinheit führen, was schließlich die Sekretion von lamininW-Trimeren initiieren könnte. Dies wird durch die Beobachtung von Lamininmarkierungen in Mitteldarm, Fettkörper und Hämocyten von *wb*; *LanA*-Doppelmutanten unterstützt, die auf die Bindung des Antikörpers an Epitope auf dem LanB1/LanB2-Dimer hindeuten. Somit ist anzunehmen, dass auch die Funktion der maternalen *wb*-Komponente im Embryo an das Vorhandensein anderer Laminin-Untereinheiten gebunden ist und maternale Wb-Ketten wahrscheinlich nicht unabhängig agieren können. Warum nur ein Laminin-Gen über eine maternale Komponente verfügt, lässt sich dadurch allerdings nicht erklären. Dies könnte vielmehr im Zusammenhang mit der zygotischen Expression von *wb* stehen, die erst ab dem Keimstreifrückzug in Mitteldarm, Herz und später auch an den Apodemen nachweisbar ist (Martin et al., 1999). Demgegenüber sind die übrigen Laminin-Untereinheiten bereits im voll verlängerten Keimstreif in der Hämocytenanlage, den Mitteldarmprimordien und dem Mesoderm entlang des Keimstreifs exprimiert. Am Ende der Embryogenese überlappen die Expressionsdomänen von allen Laminin-Untereinheiten im Herz, den Apodemen und dem Mitteldarm. In den Hämocyten und dem Fettkörper sind dagegen nur *LanA*, *LanB1* und *LanB2* nachweisbar (Montell und Goodman, 1989; Kusche-Gulberg et al., 1992; Martin et al., 1999). Somit könnte durch die ubiquitäre, maternale Expression von *wb* sichergestellt werden, dass lamininW-Trimere auch entlang des voll verlängerten Keimstreifs assembliert und sekretiert werden. Der mit starken

wb-Allelen assoziierte, transiente Keimstreifrückzugsdefekt deutet auf eine entsprechende Funktion von *wb* hin, die anhand des zygotischen Expressionsmusters nicht zu erklären wäre. Die unterschiedlichen Expressionsprofile und die individuellen Funktionen von *LanA* und *wb* beim Zusammenbau der Basallamina und der Adhäsion zwischen der ECM und Geweben würden somit auf lokale Unterschiede bei der Zusammensetzung der Basallamina hindeuten.

In dieser Dissertation konnte am Beispiel der Mitteldarmentwicklung von *Drosophila* gezeigt werden, dass externe Einflüsse aus benachbarten Geweben und der extrazellulären Matrix entscheidend auf die Differenzierung der Mitteldarmmuskulatur einwirken. Dies eröffnet eine neue Sichtweise auf die Mitteldarmentwicklung, da bislang vor allem die induktiven Eigenschaften der viszeralen Muskulatur im Zentrum der Forschung standen. Tatsächlich offenbarte die Durchmusterung der EMS-Mutantenkollektion von Hummel et al. (1999a, b) außer *hkb* und *LanB2* vor allem Gene, die direkt an der Frühentwicklung des viszeralen Mesoderms beteiligt sind. Faktoren, die spezifisch in der späteren viszeralen Muskeldifferenzierung oder in potentiellen Signalwegen zwischen Entoderm und Muskulatur wirken wurden dagegen nicht identifiziert. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Verlust solcher Faktoren erst zur Beeinträchtigung oder Letalität führt, wenn das betroffene Organ auch funktionell aktiv wird. Für die viszerale Muskulatur wäre dies während der frühen Larvalentwicklung der Fall. Ein zukünftiges Forschungsvorhaben könnte also in der Durchmusterung von larval-letalen Mutantenkollektionen nach viszeralen Phänotypen liegen. Des Weiteren könnten Mutationen in den beteiligten Genen bereits relativ früh in der Embryogenese zum Tod führen oder auch die Entwicklung andere Gewebe stark beeinträchtigen, was wiederum die Defekte in der viszeralen Muskulatur maskieren könnte. Den Einfluss solcher Faktoren zu identifizieren wäre experimentell ungleich komplizierter. So bietet *Drosophila* die Möglichkeit durch die Induktion von gewebsspezifischen, somatischen Klonen die Entwicklung mutanter Gewebsteile in einem ansonsten wildtypischen Organismus zu studieren. Wegen der geringen Anzahl von postblastodermalen Mitosen ist der Einsatz dieser Technik während der Embryonalentwicklung jedoch stark eingeschränkt.

Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse rückt nun auch die Identifikation und Analyse von Signalwegen zwischen Entoderm und viszeraler Muskulatur in den Fokus zukünftiger Forschungsvorhaben. So könnten Mutanten für die bereits erwähnten Gene *miple* und *miple2* gezielt erzeugt, und ihr Einfluss auf die Mitteldarmentwicklung analysiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der morphologischen Charakterisierung von *LanB2*-Mutanten. Die durchgeführten Analysen offenbaren eine große Bandbreite an phänotypischen Konsequenzen die direkt oder indirekt auf den Verlust von *LanB2* zurückzuführen sind. Für weiterführende Forschungsvorhaben wäre es daher ratsam, sich auf einzelne Teilaspekte der Laminin-beeinflussten Entwicklung zu beschränken. So birgt unter anderem die Analyse der Rolle von Laminin während der neuronalen Differenzierung und Innervierung ein großes Potential für zukünftige Projekte. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen bestimmten Formen der kongenitalen Muskeldystrophie und dem Funktionsverlust von einzelnen Lamininen (Carmignac und Durbeej, 2012), würde sich auch eine Analyse bezüglich des Erhalts und der Funktionsweise der Muskulatur in mutanten Larven und Fliegen anbieten. Zuvor müssten allerdings noch geeignete, hypomorphe Allele identifiziert oder generiert werden. Als Alternative könnten möglicherweise auch RNAi-„knock downs“ eingesetzt werden, deren Effizienz bereits in dieser Arbeit demonstriert werden konnte.

Auch könnte eine Analyse zur extrazellulären Verteilung der zwei unterschiedlichen Laminintrimere dazu beitragen, die Funktionsweise dieser Trimere sowie die Entstehung und Verteilung von spezialisierten extrazellulärer Matrices während der Entwicklung zu entschlüsseln. Dazu könnten in Zukunft „Protein-trap“-Allele von den *Laminin*-Genen generiert oder entsprechend markierte Laminin-Untereinheiten mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems ektopisch exprimiert werden. Dies würde dann den gezielten Nachweis von einzelnen Laminin-Untereinheiten auch innerhalb der ECM erlauben. Diese Untersuchungen könnten alternativ auch mit Hilfe von Trimer-spezifischen Antikörpern durchgeführt werden. Darüber hinaus könnte die weiterführende Analyse von genetischen Interaktionen zwischen Laminin und weiteren ECM-Komponenten helfen, die Vorgänge beim Aufbau regionaler Matrices und der Basallamina zu verstehen. Somit könnte letztlich unser Verständnis vom Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Entwicklung von Organismen entscheidend verbessert werden.

7. Internetressourcen

Berkeley *Drosophila* Genome Project (**BDGP**) @ DGS, Berkeley, USA. [Online]. Zugänglich unter: <http://www.fruitfly.org>. 29.03.2012.

Bloomington *Drosophila* Stock Center @ Indiana University, Bloomington, USA. [Online]. Zugänglich unter: <http://flystocks.bio.indiana.edu>. 29.03.2012.

Developmental Studies Hybridoma Bank (**DSHB**) @ University of Iowa, Iowa City, USA. [Online]. Zugänglich unter: <http://dshb.biology.uiowa.edu>. 29.03.2012.

DIG Application Manual for Nonradioactive *In Situ* Hybridization (4th Edition) @ Roche Diagnostics [Online]. Zugänglich unter: https://www.roche-applied-science.com/publications/print_mat/dig_application_manual_nonradioactive_insitu_hybr.pdf. 05.04.2012.

***Drosophila* Genetic Resource Center** (DGRC) @ KIT, **Kyoto**, Japan. [Online]. Zugänglich unter: <http://kyotofly.kit.jp/cgi-bin/stocks/index.cgi>. 29.03.2012.

Drosophila Genomics Resource Center (**DGRC**) @ CGB, Indiana University, Bloomington, USA. [Online]. Zugänglich unter: <https://dgrc.cgb.indiana.edu>. 29.03.2012.

The **ExpASY** (Expert Protein Analysis System) server @ SIB, Lausanne, Schweiz. [Online]. Zugänglich unter: <http://expasy.org>. 29.03.2012.

Flybase @ Indiana University, Bloomington, USA. [Online]. Zugänglich unter: <http://flybase.org>. 29.03.2012.

The **FlyTrap** GFP Protein Trap Database @ Yale University, New Haven, USA. [Online]. Zugänglich unter: <http://flytrap.med.yale.edu>. 29.03.2012.

Lab FAQs @ Roche Applied Science, USA. [Online]. Zugänglich unter: https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/index.jsp?&id=labfaqs. 29.03.2012.

NCBI PubMed @ NIH, USA. [Online]. Zugänglich unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. 29.03.2012.

Rubidium Chloride Method @ New England Biolabs Inc. [Online]. Zugänglich unter: http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/gene_expression/RbCl_protocol.asp#.T32vldVKHaw. 05.04.2012.

Vienna *Drosophila* RNAi Center (**VDRC**) @ CSF, Wien, Österreich. [Online]. Zugänglich unter: <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>. 29.03.2012.

8. Literaturverzeichnis

- Abel, T., Michelson, A. M. and Maniatis, T.** (1993). A *Drosophila* GATA family member that binds to Adh regulatory sequences is expressed in the developing fat body. *Development* **119**, 623-33.
- Adams, J. C.** (1981). Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J Histochem Cytochem* **29**, 775.
- Adams, J. C., Monk, R., Taylor, A. L., Özbek, S., Fascetti, N., Baumgartner, S. and Engel, J.** (2003). Characterisation of *Drosophila* thrombospondin defines an early origin of pentameric thrombospondins. *J Mol Biol* **328**, 479-94.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.** (2002). Molecular biology of the cell: Garland Science Taylor & Francis Group.
- Albrecht, S., Wang, S., Holz, A., Bergter, A. and Paululat, A.** (2006). The ADAM metalloprotease Kuzbanian is crucial for proper heart formation in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* **123**, 372-87.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashburner, M., Hawley, R. S. and Sullivan, W.** (2000). *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashburner, M., Tsubota, S. and Woodruff, R. C.** (1982). The genetics of a small chromosome region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. IV: scutoid, an antimorphic mutation. *Genetics* **102**, 401-20.
- Azpiazu, N. and Frasch, M.** (1993). tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* **7**, 1325-40.
- Bate, M.** (1993). The mesoderm and its derivatives. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 1013-1090. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Beck, K., Hunter, I. and Engel, J.** (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J* **4**, 148-60.
- Beckett, K. and Baylies, M. K.** (2006). The development of the *Drosophila* larval body wall muscles. *Int Rev Neurobiol* **75**, 55-70.
- Berger, S., Schäfer, G., Kesper, D. A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R. H., Beck, L., Klämbt, C., Renkawitz-Pohl, R. and Önel, S. F.** (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* **121**, 1303-13.
- Berghammer, A. J., Klingler, M. and Wimmer, E. A.** (1999). A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-1.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300.
- Bodmer, R.** (1993). The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* **118**, 719-29.
- Bogdan, S. and Klämbt, C.** (2003). Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* **130**, 4427-4437.
- Borchiellini, C., Coulon, J. and Le Parco, Y.** (1996). The function of type IV collagen during *Drosophila* muscle development. *Mech Dev* **58**, 179-91.

- Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M. and Abmayr, S. M.** (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* **14**, 1498-511.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Broadie, K., Baumgartner, S. and Prokop, A.** (2011). Extracellular matrix and its receptors in *Drosophila* neural development. *Dev Neurobiol* **71**, 1102-30.
- Brönner, G., Chu-LaGraff, Q., Doe, C. Q., Cohen, B., Weigel, D., Taubert, H. and Jäckle, H.** (1994). Sp1/egr-like zinc-finger protein required for endoderm specification and germ-layer formation in *Drosophila*. *Nature* **369**, 664-8.
- Brönner, G. and Jäckle, H.** (1991). Control and function of terminal gap gene activity in the posterior pole region of the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **35**, 205-11.
- Brower, D. L., Piovant, M. and Reger, L. A.** (1985). Developmental analysis of *Drosophila* position-specific antigens. *Dev Biol* **108**, 120-30.
- Brower, D. L., Wilcox, M., Piovant, M., Smith, R. J. and Reger, L. A.** (1984). Related cell-surface antigens expressed with positional specificity in *Drosophila* imaginal discs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7485-9.
- Brown, N. H., Gregory, S. L. and Martin-Bermudo, M. D.** (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **223**, 1-16.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Burg, M. A., Tillet, E., Timpl, R. and Stallcup, W. B.** (1996). Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* **271**, 26110-6.
- Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M.** (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 463-518.
- Buttgereit, D., Paululat, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (1996). Muscle development and attachment to the epidermis is accompanied by expression of beta 3 and beta 1 tubulin isotypes, respectively. *Int J Dev Biol* **40**, 189-96.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1985). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin/Heidelberg/New-York/Tokyo: Springer-Verlag
- Carmignac, V. and Durbeej, M.** (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *J Pathol* **226**, 200-18.
- Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R. and Vorbrüggen, G.** (2007). AlphaPS2 integrin-mediated muscle attachment in *Drosophila* requires the ECM protein Thrombospondin. *Mech Dev* **124**, 463-75.
- Chartier, A., Zaffran, S., Astier, M., Semeriva, M. and Gratecos, D.** (2002). Pericardin, a *Drosophila* type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure. *Development* **129**, 3241-53.
- Chi, H. C. and Hui, C. F.** (1989). Primary structure of the *Drosophila* laminin B2 chain and comparison with human, mouse, and *Drosophila* laminin B1 and B2 chains. *J Biol Chem* **264**, 1543-50.
- Chihara, T., Kato, K., Taniguchi, M., Ng, J. and Hayashi, S.** (2003). Rac promotes epithelial cell rearrangement during tracheal tubulogenesis in *Drosophila*. *Development* **130**, 1419-28.
- Chung, A. E., Jaffe, R., Freeman, I. L., Vergnes, J.-P., Braginski, J. E. and Carlin, B.** (1979). Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell* **16**, 277-287.

- Coisy-Quivy, M., Sanguesa-Ferrer, J., Weill, M., Johnson, D. S., Donnay, J. M., Hipskind, R., Fort, P. and Philips, A.** (2006). Identification of Rho GTPases implicated in terminal differentiation of muscle cells in ascidia. *Biol Cell* **98**, 577-88.
- Cognato, H., Winkelmann, D. A. and Yurchenco, P. D.** (1999). Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* **145**, 619-31.
- Cognato, H. and Yurchenco, P. D.** (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **218**, 213-34.
- De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C. and Giangrande, A.** (2006). Hucklebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. *Embo J* **25**, 244-54.
- Devenport, D. and Brown, N. H.** (2004). Morphogenesis in the absence of integrins: mutation of both *Drosophila* beta subunits prevents midgut migration. *Development* **131**, 5405-15.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S. et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-6.
- Englund, C., Birve, A., Falileeva, L., Grabbe, C. and Palmer, R. H.** (2006). Miple1 and miple2 encode a family of MK/PTN homologues in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* **216**, 10-8.
- Englund, C., Loren, C. E., Grabbe, C., Varshney, G. K., Deleuil, F., Hallberg, B. and Palmer, R. H.** (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature* **425**, 512-6.
- Erickson, M. R., Galletta, B. J. and Abmayr, S. M.** (1997). *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **138**, 589-603.
- Eriksson, T., Varshney, G., Aspenstrom, P. and Palmer, R. H.** (2010). Characterisation of the role of Vrp1 in cell fusion during the development of visceral muscle of *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev Biol* **10**, 86.
- Estrada, B., Gisselbrecht, S. S. and Michelson, A. M.** (2007). The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the *Drosophila* embryo. *Development* **134**, 4469-78.
- Fessler, J. H. and Fessler, L. I.** (1989). *Drosophila* extracellular matrix. *Annual Review of Cell Biology* **5**, 309-339.
- Fessler, L. I., Campbell, A. G., Duncan, K. G. and Fessler, J. H.** (1987). *Drosophila* laminin: characterization and localization. *J Cell Biol* **105**, 2383-91.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Firth, L. C. and Baker, N. E.** (2007). Spitz from the retina regulates genes transcribed in the second mitotic wave, peripodial epithelium, glia and plasmatocytes of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Dev Biol* **307**, 521-38.
- Furriols, M. and Casanova, J.** (2003). In and out of Torso RTK signalling. *Embo J* **22**, 1947-52.
- Garzino, V., Berenger, H. and Pradel, J.** (1989). Expression of laminin and of a laminin-related antigen during early development of *Drosophila melanogaster*. *Development* **106**, 17-27.
- Georgias, C., Wasser, M. and Hinz, U.** (1997). A basic-helix-loop-helix protein expressed in precursors of *Drosophila* longitudinal visceral muscles. *Mech Dev* **69**, 115-24.
- Gilmore, A. P. and Burridge, K.** (1996). Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure* **4**, 647-51.

- Goldstein, M. A. and Burdette, W. J.** (1971). Striated visceral muscle of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* **134**, 315-34.
- Gotwals, P. J., Fessler, L. I., Wehrli, M. and Hynes, R. O.** (1994). *Drosophila* PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11447-51.
- Graner, M. W., Bunch, T. A., Baumgartner, S., Kerschen, A. and Brower, D. L.** (1998). Splice variants of the *Drosophila* PS2 integrins differentially interact with RGD-containing fragments of the extracellular proteins tigrin, ten-m, and D-laminin 2. *J Biol Chem* **273**, 18235-41.
- Gratecos, D., Naidet, C., Astier, M., Thiery, J. P. and Semeriva, M.** (1988). *Drosophila* fibronectin: a protein that shares properties similar to those of its mammalian homologue. *Embo J* **7**, 215-23.
- Greener, M. J. and Roberts, R. G.** (2000). Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*. *FEBS Lett* **482**, 13-8.
- Grenningloh, G., Rehm, E. J. and Goodman, C. S.** (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* **67**, 45-57.
- Gullberg, D. and Ekblom, P.** (1995). Extracellular matrix and its receptors during development. *Int J Dev Biol* **39**, 845-54.
- Häcker, U., Kaufmann, E., Hartmann, C., Jürgens, G., Knochel, W. and Jäckle, H.** (1995). The *Drosophila* fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures. *Embo J* **14**, 5306-17.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A. and Hannon, G. J.** (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**, 110-9.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hannon, G. J.** (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-51.
- Haralalka, S. and Abmayr, S. M.** (2010). Myoblast fusion in *Drosophila*. *Exp Cell Res* **316**, 3007-13.
- Hartenstein, V.** (1993). Atlas of *Drosophila* development. In *The development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martinez Arias). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Henchcliffe, C., Garcia-Alonso, L., Tang, J. and Goodman, C. S.** (1993). Genetic analysis of laminin A reveals diverse functions during morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **118**, 325-37.
- Hortsch, M., Olson, A., Fishman, S., Soneral, S. N., Marikar, Y., Dong, R. and Jacobs, J. R.** (1998). The expression of MDP-1, a component of *Drosophila* embryonic basement membranes, is modulated by apoptotic cell death. *Int J Dev Biol* **42**, 33-42.
- Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H.** (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**, 577-80.
- Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G. and Klämbt, C.** (2000). *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* **26**, 357-70.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999a). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development* **126**, 771-9.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999b). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Dev Biol* **209**, 381-98.
- Hynes, R. O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.

- Immerglück, K., Lawrence, P. A. and Bienz, M.** (1990). Induction across germ layers in *Drosophila* mediated by a genetic cascade. *Cell* **62**, 261-8.
- Ismat, A., Schaub, C., Reim, I., Kirchner, K., Schultheis, D. and Frasch, M.** (2010). HLH54F is required for the specification and migration of longitudinal gut muscle founders from the caudal mesoderm of *Drosophila*. *Development* **137**, 3107-17.
- Iuchi, S.** (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 625-35.
- Jin, P., Duan, R., Luo, F., Zhang, G., Hong, S. N. and Chen, E. H.** (2011). Competition between Blown fuse and WASP for WIP binding regulates the dynamics of WASP-dependent actin polymerization in vivo. *Dev Cell* **20**, 623-38.
- Jürgens, G. and Weigel, D.** (1988). Terminal versus segmental development in the *Drosophila* embryo: the role of the homeotic gene fork head. *Roux's Archives of Developmental Biology* **197**, 345-354.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. and Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology* **193**, 283-295.
- Kadam, S., Ghosh, S. and Stathopoulos, A.** (2012). Synchronous and symmetric migration of *Drosophila* caudal visceral mesoderm cells requires dual input by two FGF ligands. *Development* **139**, 699-708.
- Katow, H. and Hayashi, M.** (1985). Role of fibronectin in primary mesenchyme cell migration in the sea urchin. *J Cell Biol* **101**, 1487-91.
- Katow, H., Yazawa, S. and Sofuku, S.** (1990). A fibronectin-related synthetic peptide, Pro-Ala-Ser-Ser, inhibits fibronectin binding to the cell surface, fibronectin-promoted cell migration in vitro, and cell migration in vivo. *Exp Cell Res* **190**, 17-24.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.
- Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S. N., Sens, K. L., Bo, J., Gonzalez, G. A. and Chen, E. H.** (2007). A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell* **12**, 571-86.
- King, D. G.** (1988). Cellular organization and peritrophic membrane formation in the cardia (proventriculus) of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* **196**, 253-82.
- Kispert, A., Herrmann, B. G., Leptin, M. and Reuter, R.** (1994). Homologs of the mouse Brachyury gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev* **8**, 2137-50.
- Klapper, R.** (2000). The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech Dev* **95**, 47-54.
- Klapper, R., Heuser, S., Strasser, T. and Janning, W.** (2001). A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development* **128**, 2517-24.
- Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R. and Holz, A.** (2002). The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on duf, sns and mbc. *Mech Dev* **110**, 85-96.
- Knibiehler, B., Mirre, C. and Le Parco, Y.** (1990). Collagen type IV of *Drosophila* is stockpiled in the growing oocyte and differentially located during early stages of embryogenesis. *Cell Differ Dev* **30**, 147-57.

- Kramerova, I. A., Kawaguchi, N., Fessler, L. I., Nelson, R. E., Chen, Y., Kramerov, A. A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J. M., Ackley, B. D., Sieron, A. L. et al.** (2000). Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* **127**, 5475-85.
- Kumagai, C., Kadowaki, T. and Kitagawa, Y.** (1997). Disulfide-bonding between *Drosophila* laminin beta and gamma chains is essential for alpha chain to form alpha betagamma trimer. *FEBS Lett* **412**, 211-6.
- Kusch, T. and Reuter, R.** (1999). Functions for *Drosophila* brachyenteron and forkhead in mesoderm specification and cell signalling. *Development* **126**, 3991-4003.
- Kusche-Gullberg, M., Garrison, K., MacKrell, A. J., Fessler, L. I. and Fessler, J. H.** (1992). Laminin A chain: expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *Embo J* **11**, 4519-27.
- Lawrence, P. A. and Johnston, P.** (1989). Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by even-skipped and fushi tarazu. *Development* **105**, 761-7.
- LeBleu, V. S., Macdonald, B. and Kalluri, R.** (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 1121-9.
- Lee, H. H., Norris, A., Weiss, J. B. and Frasch, M.** (2003). Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. *Nature* **425**, 507-12.
- Lee, H.-H., Zaffran, S. and Frasch, M.** (2006). Development of the Larval Visceral Musculature. In *Muscle Development in Drosophila* (ed. H. Sink), pp. 62-78. Georgetown, Texas and New York, New York: Landes Bioscience / Eurekah.com and Springer Science+Business Media, Inc.
- Leiss, D., Hinz, U., Gasch, A., Mertz, R. and Renkawitz-Pohl, R.** (1988). Beta 3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **104**, 525-31.
- Li, M. G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L. G., Field, C. M. and Hays, T. S.** (1999). Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **146**, 1061-74.
- Li, S., Harrison, D., Carbonetto, S., Fassler, R., Smyth, N., Edgar, D. and Yurchenco, P. D.** (2002). Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* **157**, 1279-90.
- Loren, C. E., Englund, C., Grabbe, C., Hallberg, B., Hunter, T. and Palmer, R. H.** (2003). A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep* **4**, 781-6.
- Loren, C. E., Scully, A., Grabbe, C., Edeen, P. T., Thomas, J., McKeown, M., Hunter, T. and Palmer, R. H.** (2001). Identification and characterization of DAlk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes Cells* **6**, 531-44.
- Luckenbill-Edds, L.** (1997). Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev* **23**, 1-27.
- Luschnig, S., Batz, T., Armbruster, K. and Krasnow, M. A.** (2006). serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 186-94.
- Mani, R., St Onge, R. P., Hartman, J. L. t., Giaever, G. and Roth, F. P.** (2008). Defining genetic interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3461-6.

- Manning G. and Krasnow, M. A.** (1993). Development of the *Drosophila* Tracheal System. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 609-687. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E. L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R. and Baumgartner, S.** (1999). wing blister, a new *Drosophila* laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J Cell Biol* **145**, 191-201.
- Martin-Bermudo, M. D., Alvarez-Garcia, I. and Brown, N. H.** (1999). Migration of the *Drosophila* primordial midgut cells requires coordination of diverse PS integrin functions. *Development* **126**, 5161-9.
- Martin-Bermudo, M. D., Dunin-Borkowski, O. M. and Brown, N. H.** (1997). Specificity of PS integrin function during embryogenesis resides in the alpha subunit extracellular domain. *Embo J* **16**, 4184-93.
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M. and Ringuette, M.** (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* **121**, 1671-80.
- Martinek, N., Zou, R., Berg, M., Sodek, J. and Ringuette, M.** (2002). Evolutionary conservation and association of SPARC with the basal lamina in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **212**, 124-33.
- Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B. Z. and Schejter, E. D.** (2007). WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* **12**, 557-69.
- McQuilton, P., St Pierre, S. E., Thurmond, J. and the FlyBase Consortium.** (2012). FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* **40**, D706-14.
- Metaxakis, A., Oehler, S., Klinakis, A. and Savakis, C.** (2005). Minos as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **171**, 571-81.
- Millard, T. H., Sharp, S. J. and Machesky, L. M.** (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380**, 1-17.
- Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G. and Sutherland, A. E.** (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* **131**, 2247-56.
- Miner, J. H. and Yurchenco, P. D.** (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 255-84.
- Montell, D. J. and Goodman, C. S.** (1988). *Drosophila* substrate adhesion molecule: sequence of laminin B1 chain reveals domains of homology with mouse. *Cell* **53**, 463-73.
- Montell, D. J. and Goodman, C. S.** (1989). *Drosophila* laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J Cell Biol* **109**, 2441-53.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W.** (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15050-5.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Narumiya, S., Tanji, M. and Ishizaki, T.** (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 65-76.
- Nose, A., Isshiki, T. and Takeichi, M.** (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the msh homeobox gene. *Development* **125**, 215-23.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. and Takeichi, M.** (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* **165**, 716-26.

- Önel, S., Bolke, L. and Klämbt, C.** (2004). The *Drosophila* ARF6-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development* **131**, 2587-94.
- Pankratz, M. J. and Hoch, M.** (1995). Control of epithelial morphogenesis by cell signaling and integrin molecules in the *Drosophila* foregut. *Development* **121**, 1885-98.
- Patel, N. H., Snow, P. M. and Goodman, C. S.** (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* **48**, 975-88.
- Perrimon, N., Ni, J. Q. and Perkins, L.** (2010). In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003640.
- Pignoni, F., Baldarelli, R. M., Steingrimsson, E., Diaz, R. J., Patapoutian, A., Merriam, J. R. and Lengyel, J. A.** (1990). The *Drosophila* gene tailless is expressed at the embryonic termini and is a member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **62**, 151-63.
- Pollard, T. D. and Cooper, J. A.** (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208-12.
- Poulson, D. F.** (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* Meigen. In *Biology of Drosophila*, (ed. M. Demerec), pp. 168--274. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Prokop, A., Martin-Bermudo, M. D., Bate, M. and Brown, N. H.** (1998). Absence of PS integrins or laminin A affects extracellular adhesion, but not intracellular assembly, of hemiadherens and neuromuscular junctions in *Drosophila* embryos. *Dev Biol* **196**, 58-76.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M. and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-31.
- Reuter, R.** (1994). The gene serpent has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* **120**, 1123-35.
- Reuter, R., Grunewald, B. and Leptin, M.** (1993). A role for the mesoderm in endodermal migration and morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **119**, 1135-45.
- Reuter, R. and Leptin, M.** (1994). Interacting functions of snail, twist and huckebein during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development* **120**, 1137-50.
- Rohde, H., Wick, G. and Timpl, R.** (1979). Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. *Eur J Biochem* **102**, 195-201.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V. and Bate, M.** (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* **102**, 189-98.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sambrook, J. and Russel, D. W.** (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Martin, B. and Bate, M.** (2001). Hindgut visceral mesoderm requires an ectodermal template for normal development in *Drosophila*. *Development* **128**, 233-42.
- San Martin, B., Ruiz-Gomez, M., Landgraf, M. and Bate, M.** (2001). A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development* **128**, 3331-3338.

- Schäfer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Müller, A., Renkawitz-Pohl, R. and Önel, S. F.** (2007). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Biol* **304**, 664-74.
- Schneider, M. and Baumgartner, S.** (2008). Differential expression of Dystroglycan-spliceforms with and without the mucin-like domain during *Drosophila* embryogenesis. *Fly (Austin)* **2**, 29-35.
- Schnorrer, F., Kalchauer, I. and Dickson, B. J.** (2007). The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev Cell* **12**, 751-66.
- Schöck, F. and Perrimon, N.** (2003). Retraction of the *Drosophila* germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev* **17**, 597-602.
- Schröter, R. H., Buttgerit, D., Beck, L., Holz, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (2006). Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular visceral muscles in *Drosophila*. *Differentiation* **74**, 608-21.
- Schröter, R. H., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klämbt, C., Beck, L. and Renkawitz-Pohl, R.** (2004). kette and blown fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* **131**, 4501-9.
- Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V. and Paululat, A.** (2006). Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr Patterns* **6**, 360-75.
- Shirinian, M., Varshney, G., Loren, C. E., Grabbe, C. and Palmer, R. H.** (2007). *Drosophila* Anaplastic Lymphoma Kinase regulates Dpp signalling in the developing embryonic gut. *Differentiation* **75**, 418-26.
- Silies, M. and Klämbt, C.** (2010). APC/C(Fzr/Cdh1)-dependent regulation of cell adhesion controls glial migration in the *Drosophila* PNS. *Nat Neurosci* **13**, 1357-64.
- Singer, J. B., Harbecke, R., Kusch, T., Reuter, R. and Lengyel, J. A.** (1996). *Drosophila* brachyenteron regulates gene activity and morphogenesis in the gut. *Development* **122**, 3707-18.
- Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. and Edgar, D.** (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* **144**, 151-60.
- Sokol, N. S. and Cooley, L.** (1999). *Drosophila* filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr Biol* **9**, 1221-30.
- Sokol, N. S. and Cooley, L.** (2003). *Drosophila* filamin is required for follicle cell motility during oogenesis. *Dev Biol* **260**, 260-72.
- Spring, J., Paine-Saunders, S. E., Hynes, R. O. and Bernfield, M.** (1994). *Drosophila* syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3334-8.
- Strecker, T. R., Kongsuwan, K., Lengyel, J. A. and Merriam, J. R.** (1986). The zygotic mutant tailless affects the anterior and posterior ectodermal regions of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **113**, 64-76.
- Stute, C.** (2004). Die Determination der Founder- und fusionskompetenten Zellen des viszeralen Mesoderms von *Drosophila melanogaster* ist abhängig von Notch sowie Jeb/Alk vermitteltem RTK-Signalweg. *Inauguraldissertation am Institut für Entwicklungsbiologie und Parasitologie des Fachbereichs Biologie (Fb 17) der Philipps-Universität Marburg.*

- Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R. H. and Holz, A.** (2004). Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on milliways(mili(Alk)) as receptor for Jeb signalling. *Development* **131**, 743-54.
- Subramanian, A., Wayburn, B., Bunch, T. and Volk, T.** (2007). Thrombospondin-mediated adhesion is essential for the formation of the myotendinous junction in *Drosophila*. *Development* **134**, 1269-78.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994). Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm. *Development* **120**, 579-90.
- Tillet, E., Gential, B., Garrone, R. and Stallcup, W. B.** (2002). NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J Cell Biochem* **86**, 726-36.
- Timpl, R. and Brown, J. C.** (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* **18**, 123-32.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. and Martin, G. R.** (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* **254**, 9933-7.
- Tremml, G. and Bienz, M.** (1989). Homeotic gene expression in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *Embo J* **8**, 2677-85.
- Urbano, J. M., Torgler, C. N., Molnar, C., Tepass, U., Lopez-Varea, A., Brown, N. H., de Celis, J. F. and Martin-Bermudo, M. D.** (2009). *Drosophila* laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* **136**, 4165-76.
- Weigel, D., Jürgens, G., Klingler, M. and Jäckle, H.** (1990). Two gap genes mediate maternal terminal pattern information in *Drosophila*. *Science* **248**, 495-8.
- Weigel, D., Jürgens, G., Kuttner, F., Seifert, E. and Jäckle, H.** (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 645-58.
- Weiss, J. B., Suyama, K. L., Lee, H. H. and Scott, M. P.** (2001). Jelly belly: a *Drosophila* LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation. *Cell* **107**, 387-98.
- Wilcox, M., Brower, D. L. and Smith, R. J.** (1981). A position-specific cell surface antigen in the drosophila wing imaginal disc. *Cell* **25**, 159-64.
- Winklbauer, R.** (1990). Mesodermal cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* **142**, 155-68.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wolfstetter, G.** (2007). Molekulare und morphologische Charakterisierung sowie genetische Interaktionen von Mutationen des viszeralen Mesoderms von *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie; Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Wolfstetter, G., Shirinian, M., Stute, C., Grabbe, C., Hummel, T., Baumgartner, S., Palmer, R. H. and Holz, A.** (2009). Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm. *Mech Dev* **126**, 721-36.
- Wolfstetter, G., Stute, C. and Holz, A.** (2008). Analysis of mutations that affect visceral muscle cell morphology and display restricted outgrowth of visceral myotubes in *Drosophila*. *European Journal of Cell Biology* **87**, 69-69.

- Woodruff, R. C. and Ashburner, M.** (1979). The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. II. Lethal mutations in the region. *Genetics* **92**, 133-49.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Yarnitzky, T. and Volk, T.** (1995). Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **169**, 609-18.
- Yi, P., Johnson, A. N., Han, Z., Wu, J. and Olson, E. N.** (2008). Heterotrimeric G proteins regulate a noncanonical function of septate junction proteins to maintain cardiac integrity in *Drosophila*. *Dev Cell* **15**, 704-13.
- Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. and Colognato, H.** (1992). Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol* **117**, 1119-33.
- Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., Guillen, A. and Semeriva, M.** (1995). Cellular interactions during heart morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Biol Cell* **84**, 13-24.
- Zaffran, S., K uchler, A., Lee, H. H. and Frasch, M.** (2001). biniou (FoxF), a central component in a regulatory network controlling visceral mesoderm development and midgut morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* **15**, 2900-15.
- Zipursky, S. L., Venkatesh, T. R., Teplow, D. B. and Benzer, S.** (1984). Neuronal development in the *Drosophila* retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* **36**, 15-26.

9. Versicherung

gemäß §17 (2) der Promotionsordnung der Gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften für die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 4. Februar 2005.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den _____

10. Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meiner Familie sowie allen Freunden und Kollegen bedanken, die auf die eine oder andere Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen gilt mein Dank Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für die Betreuung des Promotionsvorhabens, die kritische Durchsicht dieses Manuskripts sowie sein offenes Ohr in allen anfallenden Fragen.

Bei Prof. Dr. Tina Trenczek möchte ich mich für die Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung, für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts und für die sehr hilfreichen Anmerkungen, Tipps und Tricks zu meinen Experimenten bedanken.

Nicht genug danken kann ich Dr. Anne Holz für die Bereitstellung des Themas, die Finanzierung im Rahmen eines DFG-geförderten Projekts und die ausnahmslos hervorragende Betreuung während dieser Arbeit. „Frau Doktor“ hat es stets verstanden „Ihm“ die richtige Balance zwischen wissenschaftlicher Entfaltung („die Blinden führen die Nackten“) und zielführendem Arbeiten („gut gemeint ist das Gegenteil von gut gemacht“) zu vermitteln. Außerdem möchte ich mich für ihre „Ungeduld“ bei der Durchsicht dieses Manuskripts und die Beschwerden wegen der „immer noch zu vielen Seiten“ bedanken. Ihre wiederholten Versuche mich zum effizienten Verwerten von Kalorien zu bewegen waren löblich aber sinnlos. Vielen Dank, Anne!

Prof. Dr. Christian Klämbt möchte ich für den *3B1-038*-Stamm sowie die hilfreiche Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Ruth Palmer, Dr. Magret Shirinian und Prof. Dr. Stefan Baumgartner für die gute Zusammenarbeit während des *gürtelchen*-Projekts.

Bei Ruth Hyland möchte ich mich für die Injektion der *LanB2*-Konstrukte herzlich bedanken.

Auch bei allen Mitarbeitern und Ehemaligen möchte ich mich für die schöne Zeit am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie; Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie recht herzlich bedanken. Als da wären...

...Prof. Dr. Rudolf Schipp, Prof. Dr. Dieter Eichelberg, Prof. Dr. Erhard Schulte, Dr. Björn „Phase 2“ Fuchs, Dr. Christoph „anyhow“ Schaub, Dr. Raphael Pajaziti („Briefe an irgendwen“ und „Der Käfer“), D(a)r(th). Christian Melaun, Dr. Henni Schmidtberg, Dr. Bettina Westermann, Dr. Knut Beuerlein, Dr. Ellen Kauschke, Dr. Firat Gökçen, Katrin „Chhhh“ Domsch, Anke Gökçen, Christoph von Bredow, Yvette Kühnel, Ina Dahlitz, Alena Evers, Kristina Preuße, Jamil Obayd, Anne Brand, Andreas Görres, Daniel Pfeifer und Sehrish Mubarik.

Brigitte Fronk (Die gute Seele des Labors), Renate Plass mit den „Eierchen“, Lilli Schmidt, Jörg Schmandt, Birgit Viehmann, Irmgard Römer, Sabine Wagner, Susanne Vasoldt-Kröckel, Janine Friedel und Anita Diebel.

Kathrin Pfeifer danke ich zweimal.

Appendix

$$\begin{aligned}
 P: & w[1118]; \frac{+}{+} x \frac{w[1118]}{y}; \frac{3B1 - 038}{TM3, Sb[1]} \\
 F1: & w[1118]; \frac{3B1 - 038}{+} x \frac{w[1118]}{y}; \frac{Dr[1]}{TDIZ, Sb[1]} \\
 F2: & w[1118]; \frac{Dr[1]}{TDIZ, Sb[1]} x \frac{w[1118]}{y}; \frac{3B1 - 038 - R[*]}{TDIZ, Sb[1]} \\
 F3: & w[1118]; \frac{3B1 - 038 - R[*]}{TDIZ, Sb[1]} x \frac{w[1118]}{y}; \frac{3B1 - 038 - R[*]}{TDIZ, Sb[1]}
 \end{aligned}$$

Abbildung A1: Kreuzungsschema zur Erzeugung rekombinanter 3B1-038-Chromosome. Die Männchen eines *TM3, Sb1* (*Third multiple 3* mit dem dominanten Marker *Stubble¹*)-balancierten *3B1-038*-Stammes wurden direkt mit *white¹¹¹⁸* (*w¹¹¹⁸*)-Weibchen gekreuzt. Die weiblichen Nachkommen aus dieser Kreuzung wurden auf das Fehlen des Balancer-assoziierten, dominanten Markers *Sb¹* selektiert. In der Keimbahn dieser Weibchen kommt es zur homologen Rekombination zwischen *3B1-38* und einem wildtypischen (+) III. Chromosom. Werden diese Tiere nun mit *Dropped¹* (*Dr¹*, ein dominanter Marker)/*TDIZ* (*TM3, Deformed-lacZ*)-Männchen gekreuzt, können in der Folgegeneration einzelne Rekombinationsergebnisse (dargestellt als *3B1-038-R**) isoliert und daraufhin als balancierte Stämme etabliert werden. **P**= Parentalgeneration, **F1-3**= Filialgenerationen, **y**= männliches Geschlechtschromosom.

Tabelle A1: Auswertung der Allelietests mit rekombinanten 3B1-038-Linien. In den einzelnen Feldern ist die Letalität bzw. Vitalität der transheterozygot-mutanten Nachkommen angegeben, die aus den Kreuzungen zwischen den entsprechenden Allelen der linken Spalte und der ersten Reihe hervorgehen.

	3B1-038	3B1-038-R1	3B1-038-R2	3B1-038-R4	3B1-038-R9	l(3)67BDb ¹	Df(3L)AC1
3B1-038		letal	letal	letal	letal	letal	letal
3B1-038-R1	letal		letal	letal	vital	vital	vital
3B1-038-R2	letal	letal		letal	vital	vital	vital
3B1-038-R4	letal	letal	letal		letal	letal	letal
3B1-038-R9	letal	vital	vital	letal		letal	letal
l(3)67BDb ¹	letal	vital	vital	letal	letal		letal
Df(3L)AC1	letal	vital	vital	letal	letal	letal	

Tabelle A2: Zusammenfassung der Komplementationsanalyse zur chromosomalen Lokalisation der viszeralen Mutationen auf dem 3B1-038-Chromosom. Auflistung der verwendeten Defizienzenstämme unter Berücksichtigung der Bloomington (Bl-)Nomenklatur, des Genotyps, der chromosomalen Bruchpunkte sowie den Ergebnissen aus den Komplementationskreuzungen mit 3B1-038. Von Stute (2004) verwendete Linien, sind in der Tabelle entsprechend gekennzeichnet, auch wenn diese Stämme während dieser Arbeit erneut getestet wurden. Linien, welche die viszerale Allele *gürtelchen* und *knödel* nicht komplementieren sind fett hervorgehoben. Die Auflistung enthält auch jene Stämme, die nach der erfolgreichen Lokalisation der viszeralen Mutationen nicht mehr getestet wurden. *=In einer ersten Komplementationsanalyse konnte *gürtelchen* aufgrund des fehlerhaften oder falsch beschriebenen Stamms Bl-1518 nicht lokalisiert werden. Diese Linie wurde mittlerweile aus der Bloomington Stammsammlung entfernt (Flybase Datenbank, 17.11.2011).

Drittes Chromosom, linker Arm:			
Bl-Stammnummer	Genotyp	Bruchpunkte	x 3B1-038/TM3
Bl-5838	<i>Df(3L)B71, y[+]/TM6C, Sb[1]</i>	3Lt--61B	nicht allelisch (n.a.)
Bl-2577	<i>Df(3L)emc-E12/TM6B, Tb[1] ca[1]</i>	61A--61D3	n.a. Stute, 2004 (S)
Bl-8053	<i>w[1118]; Df(3L)ED207, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED207/TM2</i>	61C9--62A6	
Bl-600	<i>Df(3L)Aprt-1, ru[1] h[1]/TM3, Ser[1]</i>	62B1--62D2	
Bl-2400	<i>Df(3L)R-G7, rho[ve-1]/TM6B, Tb[1]</i>	62B9--62E7	
Bl-6755	<i>Df(3L)BSC23, rho[ve-1] e[1]/TM2, p[p]</i>	62E8--63B5	
Bl-8059	<i>w[1118]; Df(3L)ED208, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED208/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	63C1--63F5	n.a.
Bl-3687	<i>w[1118]; Df(3L)GN50, e[*]/TM8, l(3)DTS4[1]</i>	63E2--64B17	
Bl-3096	<i>Df(3L)ZN47, ry[506]/TM3, Sb[1]</i>	64C--65C	n.a. S
Bl-4393	<i>w[*]; Df(3L)XDI98, e[1]/TM6B, Tb[1]</i>	65A2--65E1	n.a. S
Bl-4562	<i>Df(3L)RM5-2/TM6B, Tb[1]</i>	65E--66A17	
Bl-1420	<i>Df(3L)pbl-X1/TM6B, Tb[1]</i>	65F3--66B10	n.a.
Bl-5877	<i>w[1]; Df(3L)ZP1/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	66A17--66C5	n.a. S
Bl-6460	<i>Df(3L)BSC13, rho[ve-1] e[1]/TM2, p[p]</i>	66B12--66D4	n.a. S
Bl-3024	<i>Df(3L)h-i22, h[i22] Ki[1] rn[roo-1] p[p]/TM3, Ser[1]</i>	66D10--66E2	n.a. S
Bl-4500	<i>Df(3L)Scf-R6, th[1] st[1] cu[1] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, Sb[1]</i>	66E--66F	allelisch (a) S
Bl-7079	<i>Df(3L)BSC35, rho[ve-1] e[1]/TM3, P{w[+m*]=Ubx-lacZ.w[+]}TM3, Sb[1]</i>	66F1--67B3	n.a.
Bl-997	<i>Df(3L)AC1, rn[roo-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	67A2--67D13	a., knödel
Bl-9355	<i>w[1118]; Df(3L)ED4457, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4457/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	67E2--68A7	n.a.
Bl-2611	<i>Df(3L)vin5, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	68A2--69A1	n.a.
Bl-2612	<i>Df(3L)vin7, h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	68C8--69B5	n.a.
Bl-5492	<i>w[*]; Df(3L)eyg[C1]/TM3, P{ry[+i7.2]=ftz/lacC}SCL, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	69A4--69D6	n.a. S
Bl-6456	<i>Df(3L)BSC10, rho[ve-1] e[1]/TM3, Ser[1]</i>	69D4--69F7	n.a. S
Bl-6457	<i>Df(3L)BSC12, rho[ve-1] e[1]/TM3, P{w[+m*]=Ubx-lacZ.w[+]}TM3, Sb[1]</i>	69F6--70A2	n.a. S
Bl-8097	<i>w[1118]; Df(3L)ED4502,</i>	70A3--70C10	n.a.

	<i>P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4502/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>		
Bl-3124	<i>Df(3L)fc-GF3b, P{w[+tAR]ry[+t7.2AR]=wA[R]}66E/TM6B, Tb[+]</i>	70C2--70D5	n.a. S
Bl-3126	<i>Df(3L)fc-M21, st[1]/TM6</i>	70D2--71E5	n.a. S
Bl-6551	<i>Df(3L)XG5/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	71C2--72C1	a. S
Bl-2993	<i>Df(3L)st-f13, Ki[1] rn[roe-1] p[p]/TM6B, Tb[1]</i>	72C1--73A4	n.a. S
Bl-197	<i>Df(3L)st-b11, Ki[1] rn[roe-1] p[p]/TM6B, Tb[1]</i>	72D10--73D2	
Bl-8098	<i>w[1118]; Df(3L)ED4674, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4674/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	73B5--73E5	n.a.
Bl-8099	<i>w[1118]; Df(3L)ED4685, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4685/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	73D5--74E4	n.a.
Bl-6411	<i>Df(3L)BSC8/TM3, Ser[1]</i>	74D3--75B5	n.a. S
Bl-2990	<i>Df(3L)Cat, kni[ri-1] Sb[sbd-1] e[*]/TM3, Ser[1]</i>	75C1--75F1	
Bl-8082	<i>w[1118]; Df(3L)ED4782, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4782/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	75F2--76A1	
Bl-6754	<i>w[*]; Df(3L)fc2/TM6B, Tb[1]</i>	75F10--76A5	n.a.
Bl-6646	<i>Df(3L)BSC20, st[1] ca[1]/TM6B, Tb[1]</i>	76A7--76B5	n.a.
Bl-5126	<i>Df(3L)XS533/TM6B, Sb[1] Tb[1] ca[1]</i>	76B4--77B1	n.a. S
Bl-2052	<i>Df(3L)rdgC-co2, th[1] st[1] in[1] kni[ri-1] p[p]/TM6C, cu[1] Sb[1] Tb[1] ca[1]</i>	77A1--77D1	n.a. S
Bl-3127	<i>Df(3L)ri-79c/TM3, Sb[1]</i>	77B7--77F5	n.a. S
Bl-4429	<i>Df(3L)ME107, mwh[1] red[1] e[1]/TM1, red[*]</i>	77F3--78C9	
Bl-4430	<i>Df(3L)Pc-2q, ry[506]/TM2</i>	78C5--79A1	n.a. S
Bl-9700	<i>w[1118]; Df(3L)BSC223, P+PBac{XP5.WH5}BSC223/TM6C, Sb[1]</i>	79A3--79B3	n.a.
Bl-23149	<i>w[1118]; Df(3L)BSC249, P+PBac{XP5.WH5}BSC249/TM6C, Sb[1] cu[1]</i>	79B2--79D2	n.a.
Bl-8089	<i>w[1118]; Df(3L)ED230, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED230/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	79C2--80A4	
Bl-8102	<i>w[1118]; Df(3L)ED5017, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED5017/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	80B1--80C3	a.
Bl-2593	<i>Df(3L)3-52, kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	80F--80F	
Drittes Chromosom, rechter Arm:			
Bl-1518	<i>Df(YS)bb[-]; Df(3R)ME15, mwh[1] red[1] e[4]/MKRS</i>	81F3--82F7	n.a. S*
Bl-9075	<i>w[1118]; Df(3R)ED5020, P{3'.RS5+3.3'}ED5020/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	82A1-82A5	a., gürtelchen
Bl-8965	<i>w[1118]; Df(3R)ED5156, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED5156/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	82F8--83A4	n.a.
Bl-7623	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6144, P{w[+mC]=XP-U}Exel6144/TM6B, Tb[1]</i>	83A6--83B6	
Bl-7443	<i>Df(3R)BSC47, st[1] ca[1]/TM3, P{w[+m*]=Ubx-lacZ.w[+]}TM3, Sb[1]</i>	83B7--83D1	
Bl-2393	<i>Df(3R)WIN11, Ki[1] rn[roe-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	83E1--84B1	a. S
Bl-1842	<i>Df(3R)Antp17/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	84A5--84D14	n.a.
Bl-1968	<i>Df(3R)p712, red[1] e[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	84D4-6--85B6	
Bl-1962	<i>Df(3R)p-XT103, ru[1] st[1] e[1] ca[1]/TM3, Sb[1]</i>	85A2--85C2	
Bl-6756	<i>Df(3R)BSC24, st[1] ca[1]/TM3, Ser[1]</i>	85C4--85D14	
Bl-1931	<i>Df(3R)by10, red[1] e[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	85D8--85E13	n.a. S
Bl-9080	<i>w[1118]; Df(3R)ED5454, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED5454/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	85E5--85F12	n.a.
Bl-7080	<i>Df(3R)BSC38, st[1] ca[1]/TM2, p[p]</i>	85F1--86C8	
Bl-3128	<i>Df(3R)M-Kx1/TM3, Sb[1]</i>	86C1--87B5	n.a. S
Bl-3003	<i>Df(3R)T-32, (kni[ri-1]) cu[1] sr[1] e[s]/MRS</i>	86E2--87C7	
Bl-3007	<i>Df(3R)ry615/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	87B12--87E8	n.a. S
Bl-383	<i>Df(3R)ea, kni[ri-1] p[p]/TM3, Ser[1]</i>	88E7--89A1	n.a. S
Bl-756	<i>Df(3R)sbd105, p[p] Ubx[bx-1] sr[1] e[s]/TM3, Ser[1]</i>	89A1--89B10	n.a.
Bl-9481	<i>w[1118]; Df(3R)ED10639, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED10639/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	89B7--89D2	
Bl-7737	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6270, P{w[+mC]=XP-U}Exel6270/TM6B, Tb[1]</i>	89D2--89D8	
Bl-4431	<i>Df(3R)DG2/TM2, red[1]</i>	89E--91B2	a. S
Bl-3011	<i>Df(3R)Cha7, red[1]/TM6B, Tb[1]</i>	90F1--91F5	n.a. S
Bl-3012	<i>Df(3R)DI-BX12, ss[1] e[4] ro[1]/TM6B, Tb[1]</i>	91F1--92D6	n.a. S

Bl-4962	<i>Df(3R)H-B79, e[*]/TM2</i>	92B3--92F13	n.a. S
Bl-7413	<i>Df(3R)BSC43, st[1] ca[1]/TM2, p[p]</i>	92F7--93B6	
Bl-2425	<i>Df(3R)e-N19/TM2</i>	93B2--94A8	n.a. S
Bl-2586	<i>Df(3R)23D1, ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	94A3--94D4	n.a. S
Bl-8491	<i>Df(3R)BSC55/TM2</i>	94D2--94E6	
Bl-8583	<i>Df(3R)BSC56, st[1] ca[1]/TM2</i>	94E1--94F2	
Bl-7673	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6194, P{w[+mC]=XP-U}Exel6194/TM6B, Tb[1]</i>	94F1--95A4	
Bl-7674	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6195, P{w[+mC]=XP-U}Exel6195/TM6B, Tb[1]</i>	95A4--95B1	
Bl-2585	<i>cn[1]; Df(3R)mbc-R1, ry[506]/TM3, ry[*] Sb[1] Ser[1]</i>	95A5--95D11	n.a. S
Bl-9347	<i>w[1118]; Df(3R)ED6187, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED6187/TM2</i>	95D10--96A7	
Bl-2363	<i>Df(3R)crb87-5, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]</i>	95F7--96A18	n.a. S
Bl-9211	<i>w[1118]; Df(3R)ED6220, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED6220/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	96A7--96C3	n.a.
Bl-7681	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6202, P{w[+mC]=XP-U}Exel6202/TM6B, Tb[1]</i>	96D1--96E2	
Bl-7682	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6203, P{w[+mC]=XP-U}Exel6203/TM6B, Tb[1]</i>	96E2--96E6	
Bl-5601	<i>Df(3R)Esp13/TM6C, cu[1] Sb[1] Tb[1] ca[1]</i>	96F1--97B1	n.a. S
Bl-1910	<i>Df(3R)Tl-P, e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]</i>	97A--98A2	a. S
Bl-823	<i>Df(3R)D605/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	97E3--98A5	n.a. S
Bl-7412	<i>Df(3R)BSC42, st[1] ca[1]/TM3, Sb[1]</i>	98B1--98B5	n.a.
Bl-7726	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6259, P{w[+mC]=XP-U}Exel6259/TM6B, Tb[1]</i>	98C4--98D6	
Bl-430	<i>w[1118]; Df(3R)3450/TM6B, Tb[1]</i>	98E3--99A6	n.a. S
Bl-669	<i>w[*]; Df(3R)Dr-rv1, ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	99A1--99B11	n.a. S
Bl-7691	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6213, P{w[+mC]=XP-U}Exel6213/TM6B, Tb[1]</i>	99C5--99D1	
Bl-2352	<i>Df(3R)X3F, P{ry[+t7.2]=RP49}A3-84F e[1]/TM3, Sb[1]</i>	99D1--99E1	
Bl-7692	<i>w[1118]; Df(3R)Exel6214, P{w[+mC]=XP-U}Exel6214/TM6B, Tb[1]</i>	99D5--99E2	
Bl-2599	<i>Df(3R)tll-g, ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	99F1--100B5	
Bl-5415	<i>Df(3R)tll-e, ca[1]/TM6B, Tb[1] ca[1]</i>	100A2--100C3	
Bl-3369	<i>y[*]; Df(3R)awd-KRB, e[*] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	100D1--100D4	n.a.
Bl-1011	<i>bw[1]; Df(3R)faf-BP, st[1]/TM6B, Tb[1]</i>	100D1--100F	

Tabelle A3: Zusammenfassung der Komplementationsanalyse zur chromosomalen Lokalisation von *knödel*. Auflistung der 60 verwendeten Komplementationsgruppen für das chromosomale Subintervalls 67A2-67D13. Angegeben sind die Bloomington (Bl-)Stammnummer, der entsprechende Genotyp, sowie die Ergebnisse aus den Komplementationskreuzungen mit *3B1-038-R9 (knödel)*. Linien, die *knödel* nicht komplementieren können, sind fett hervorgehoben.

Bl-Stammnummer	Genotyp	x <i>3B1-038-R9/TM6b</i>
Bl-1464	<i>In(3L)C90[L]P[R], In(3R)Ubx[P18], Ubx[1] Ubx[P18] e[4]/In(3L)P[L]C90[R]</i>	nicht allelisch (n.a.)
Bl-1949	<i>w[1118]; P{w[+mC]=NM}67B P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2478	<i>l(3)67BDa[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2479	<i>Df(3L)29A6, kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2480	<i>l(3)67BDb[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	allelisch (a.), <i>LanB2[2]</i>
Bl-2488	<i>l(3)67BDc[2] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2489	<i>l(3)67BDd[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2493	<i>l(3)67BDe[2] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2502	<i>l(3)67BDf[2] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2504	<i>l(3)67BDg[2] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2509	<i>l(3)67BDh[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2514	<i>l(3)67BDi[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2516	<i>l(3)67BDj[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2520	<i>l(3)67BDl[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2521	<i>l(3)67BDM[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-2542	<i>l(3)67BDn[1] kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
Bl-4548	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}aay[S042314]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
Bl-5621	<i>y[d2] w[1118] P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2 P{GMR-lacZ.C(38.1)}TPN1; Rps17[4] P{w[+t*] ry[+t*]=white-un1}70C</i>	n.a.

	<i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B/TM6B, P{y[+t7.7]ry[+t7.2]=Car20y}TPN1, Tb[1]</i>	
BI-BI-5880	<i>vnc[2] kni[ri-1] e[1]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-5881	<i>vnc[14] kni[ri-1] e[1]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-6177	<i>RpS17[6]/TM2</i>	n.a.
BI-6330	<i>y[1]; Dp(1;3)sc[J4], y[+], RpS17[4]/TM1</i>	kein viszeraler Phänotyp
BI-6358	<i>w[*]; RpS17[4] P{w[+mC]=arm-lacZ.V}70C P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-6372	<i>w[1118]; P{w[+mC]=lacW}Gap1[mip-w+]/TM6C, Sb[1] Tb[1]</i>	n.a.
BI-7079	<i>Df(3L)BSC35, rho[ve-1] e[1]/TM3, P{w[+m*]=Ubx-lacZ.w[+]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-7442	<i>Df(3L)BSC46, rho[ve-1] e[1]/TM3, Ser[1]</i>	n.a.
BI-7593	<i>w[1118]; Df(3L)Exel6114, P{w[+mC]=XP-U}Exel6114/TM6B, Tb[1]</i>	a., Df-LanB2
BI-7933	<i>w[1118]; Df(3L)Exel9048, PBac{w[+mC]=WHr}Exel9048/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-8066	<i>w[1118]; Df(3L)ED4421, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4421/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	n.a.
BI-8648	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}eIF-4E[S058911]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-8654	<i>w[*]; P{w[+mC]=eIF-4E[Ser251Ala].8.9}2/CyO; P{w[+mC]=lacW}eIF-4E[S058911]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-9221	<i>Df(3L)ED4416, w[1118] P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED4416/TM6C, cu[1] Sb[1]</i>	n.a.
BI-10172	<i>y[1] w[1118]; P{w[+mC]=lacW}l(3)L0539[L0539]/TM3, Ser[1]</i>	n.a.
BI-10254	<i>mwh[1] P{hsneo}l(3)neo16[1] red[1] e[1]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-10724	<i>P{ry[+t7.2]=ry11}ms(3)ry5[1], mwh[1] ry[506] e[1]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-11549	<i>y[1]; P{ry[+t7.2]=PZ}l(3)01859[01859] ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-11549	<i>y[1]; P{ry[+t7.2]=PZ}l(3)01859[01859] ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-11558	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}fry[02240] ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-11720	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}eIF-4E[07238] ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-12077	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}l(3)j2B9[j2B9]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-12078	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}Uch-L3[j2B8]/TM3, Sb[1]</i>	n.a.
BI-13338	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}KG02994 ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-13677	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}PGRP-LF[KG00542a] P{SUPor-P}UGP[KG00542b] ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-14501	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG3891[KG06786] ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-14595	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG8108[KG05452] ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-14607	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}path[KG06640] ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-15068	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4080[EY01375]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-15275	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}phol[KG10524] ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-16342	<i>y[1] w[1118]; PBac{y[+mDint]=3HPy[+]}Taf2[C341]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-16367	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG3408[EY05084]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-17269	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Klp67A[EP3516]/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-17277	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}EP3710/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-17737	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}CG3335[c05958]/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-17746	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}defl[c06100]/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.

BI-18664	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}UGP[f03515]/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-19267	<i>w[1118]; P{w[+mC]=XP}UGP[d07256]/TM6B, Tb[1]</i>	n.a.
BI-20460	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+t7.7] w[+mC]=wHy}fry[DG23312]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-20776	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}UGP[EY13829] CG32040[EY13829]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-20919	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG8108[EY14316]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	n.a.
BI-24284	<i>w[1118]; Mi{ET1}LanB2[MB04039]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	a.

Sequenzierung des *pUAST-LamininB2 (UAS-LanB₂)*-Konstrukts

5'-Sequenz:

GGNNNNANNTTGATACAGAAGAGACTCTGATAGGGAATTGGGAATTCGGCACGAGCGTTAACGGT
 TGCCTGCGTCTTCTGAGCGACGAACATATGAAGTCGCTCAGGCACACCAACAAGAATAGGATTTTCG
 TAATGAATTGACGAGCGAGACACCAAAGTACAACCTCGAAGGAACAACCCACCAGCCCAGAGAGC
 CACACAGACTTTGGAATTTCTCCACTCGTCCTAGTGACACCCAAGCCCACCTGTAGCCCAACGAGC
 CACCCAAAACCGAACCCACCATGAAGCGCAGCCGGTGGAGCCACAGTGGCTCCTCCACGGCTCGA
 CTCCTGCTGATCGGAGTATTGTTTC

3'-Sequenz:

NTATCNCAGAGTAGGTTCCCTTCACAAAAGATCCTCTAGAGGTACCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 ACAAACCTTACAACGTTGGAAAAGTTATATTTTTGAAAGGAAACTCTTTAAGCGACTTATACACAAAG
 ATACATGGTAATTGTATTGGCACATTAACGTAGATGACAAATATGTTAATATATAAGTGTTTAGA
 ATAGACTTCAGGTGGAGCTACGGTAGAGATATAGATATGCGATTGGATTGTCCGATTGTGGGAGTA
 CAAGGTCTTGTGTGTTTCGTTTAGTGTCTCATTTTTAACATATAATACAGTCCGTTGCTGGCTTGAA
 ACTGGTGAAGCACAGTTG