

Analysen zur Regulation und  
Komposition der extrazellulären Matrix  
von *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades in den  
Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08 - Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Uwe Töpfer

geboren in Bad Nauheim

Diese Arbeit wurde gemäß den Richtlinien der Promotionsordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche (7.40.12 Nr. 1) der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 21.01.2016 am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Erster Gutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn

Zweite Gutachterin: Dr. habil. Susanne Önel

**Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:**

Wolfstetter, G., Dahlitz, I., Pfeifer, K., Töpfer, U., Alt, J.A., Pfeifer, D.C., Lakes-Harlan, R., Baumgartner, S., Palmer, R.H., and Holz, A. (2019). Characterization of *Drosophila Nidogen/entactin* reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning. *Development* 146, dev168948.

**Inhalte der vorliegenden Arbeit sollen als folgende Originalpublikation veröffentlicht werden:**

Töpfer, U., Bischoff, M.C., Bartkuhn, M., and Holz, A. (2019). dGATAb/Serpent is the main regulator of *Laminin B1* and *B2*. *Manuskript eingereicht zur Publikation*.

Töpfer, U., Bischoff, M.C., and Holz, A. Tissue-specific secretion of Laminins is essential for basement membrane assembly. *Manuskript in Vorbereitung*.

Töpfer, U., Dahlitz, I., and Holz, A. Distinct roles of *Mmps* for midgut ECM remodeling during *Drosophila* metamorphosis. *Manuskript in Vorbereitung*.

**Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Tagungsbeiträgen veröffentlicht:**

Posterpräsentation mit dem Titel „Characterization of *Drosophila Nidogen/entactin* reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning “  
Joint Meeting of the German and Israeli Societies of Developmental Biology 2019, Wien

Vortrag mit dem Titel „Transcriptional regulation and tissue-specific expression of *Laminin B1* and *Laminin B2* depends on dGATAb/Serpent“  
12th GfE School „Imaging and Modeling Development“ 2018, Günzburg

Posterpräsentation mit dem Titel „Gene regulation of *Laminin* subunits in the *Drosophila* embryo“  
Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists 2017, Kiel

## Verwendete Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaar
BI	Basallamina
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
cm	Zentimeter
CRM	<i>cis regulative module</i>
DAB	Diaminobenzidin
dd H <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IE	<i>intronic enhancer</i>
IgG	Immunglobulin G
IH	Immunhistochemische
kb	Kilobase
l	Liter
M	Molar
m	Meter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
SD	<i>standard derivation</i> (Standardabweichung)
SE	<i>standard error</i> (Standardfehler)
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Units (Enzymmenge, die unter Optimalbedingungen 1 µM Substrat/Minute umsetzt)
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UE	<i>upstream enhancer</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenteile (Teil einer Lösung im Verhältnis zum Gesamtvolumen)
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem
(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil
∅	Durchmesser
µ	Mikro
%	Prozent
°C	Grad Celsius

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Summary	3
<b>2. Einleitung</b>	5
2.1. Der Aufbau der extrazellulären Matrix	5
2.2. Die initiale Assemblierung der extrazellulären Matrix durch Laminin	6
2.3. Die Verlinkung der extrazellulären Matrix durch Nidogen	7
2.4. Der Abbau der extrazellulären Matrix durch Matrix Metalloproteinasen	8
2.5. Vorgegangene Arbeiten und Aufgabenstellung	9
<b>3. Material</b>	10
3.1. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	10
3.1.1. Allgemeiner Laborbedarf	10
3.1.2. Stammhaltung <i>Drosophila melanogaster</i>	10
3.1.3. Chemikalien	10
3.2. Lösungen und Puffer	10
3.3. Geräte	10
3.4. Reagenziensätze	11
3.5. Größenstandards	12
3.6. Medien zur Stammhaltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	12
3.7. Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	12
3.8. Antikörper und Seren	12
3.8.1. Primärantikörper	12
3.8.2. Sekundärantikörper	13
3.8.3. Seren	14
3.9. Fluoreszenzfarbstoffe	14
3.10. Einbettungsmedien und Immersionsöl	14
3.11. Enzyme und Puffer	14
3.12. Primerliste	15
3.13. Vektoren	16
3.14. Bakterienstämme	16
3.15. Fliegenstämme	16
3.16. Verwendete Software	18
<b>4. Methoden</b>	19
4.1. Präparation genomischer DNA	19

4.2. Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	19
4.2.1. Quantitative Polymerase Kettenreaktion	20
4.3. Agarosegelelektrophorese	20
4.3.1. Denaturierende RNA Agarosegelelektrophorese	21
4.4. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	21
4.4.1. OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie	21
4.4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA mittels Agarosegel-elektrophorese	21
4.5. Enzymatischer Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	21
4.6. Klonierung von DNA-Fragmenten	22
4.6.1. Ligation	22
4.6.1.1. Ligation mittels TA-Ligation	22
4.6.2. Transformation	22
4.6.3. Klon-Check-PCR	23
4.6.4. Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA mit der Antarktischen Phosphatase	23
4.7. DNA-Präparation	23
4.7.1. Minipräparation	23
4.7.2. Midipräparation	25
4.8. Reinigung von DNA	25
4.8.1. Reinigung von DNA durch Silikamembranen	25
4.8.2. Alkoholfällung	25
4.9. <i>in vitro</i> Transkription	26
4.10. mRNA-Sonden Dot Blot	27
4.11. Sequenzierung	27
4.12. Synthese der Oligonukleotide	27
4.13. Chromatin-Immunpräzipitation	28
4.13.1. Quervernetzung der DNA-Protein Interaktion	28
4.13.2. Sonifizierung	28
4.13.3. Chromatin Immunpräzipitation	29
4.13.4. Auflösung der DNA Protein Interaktion	29
4.14. Protein Präparation	30
4.15. Protein Dot Blot	30
4.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	31
4.17. Western Blot	31
4.18. Anfertigung von histologischen Schnitten mit Kryomikrotom	32
4.18.1. Präparation von Puppen	32
4.18.2. Infiltration	33

4.18.3.	Einfrieren der Proben	33
4.18.4.	Schneiden	33
4.18.5.	Antikörperfärbung	34
4.19.	Bioinformatische Analysen	34
4.19.1.	<i>In silico</i> Vorhersage von potentiellen Transkriptionsfaktor Bindestellen	34
4.19.2.	Darstellung von Proteindomänen	35
4.19.3.	Analyse der Konservierung von Aminosäuresequenzen	35
4.20.	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen	35
4.21.	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	35
4.21.1.	Erzeugung von transgenen Fliegen	35
4.21.2.	Haltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	35
4.21.3.	Kreuzungen	35
4.21.4.	Balancieren	36
4.21.5.	Gal4-UAS-System	36
4.21.6.	RNAi-Induktion	36
4.21.7.	Ablage der Embryonen	37
4.21.8.	Entchorionisierung und Fixierung von Embryonen	37
4.21.9.	Fixierung von Larven und Puppen	38
4.21.10.	<i>Ex vivo</i> Analyse von Hämocyten	38
4.21.11.	<i>In situ</i> Hybridisierung	38
4.21.12.	Antikörperfärbung an Embryonen	40
4.21.13.	Antikörperfärbung von Larven und Puppen	41
4.21.14.	Phalloidin-Färbung an Larven und Puppen	41
4.21.15.	X-Gal-Färbung	41
4.21.16.	Allelietest	41
4.21.17.	Letalitätstest	42
4.21.18.	Fertilitätstest	42
4.21.19.	Bestimmung von Entwicklungsstadien	43
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
5.1.	Die transkriptionelle Regulation und die gewebespezifische Expression von <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i> ist abhängig von <i>Srp/dGATAb</i>	44
5.1.1.	Die Reporterexpression von <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i> .	44
5.1.2.	Die Abwesenheit von Hämocyten offenbart eine frühe gewebespezifisch produzierte ECM	46
5.1.3.	<i>In silico</i> Vorhersage von potentiellen Serpent-Bindestellen in <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i>	50

5.1.4.	<i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i> Reporter-gen-Expression in <i>serpent</i> mutanten Hintergrund und gewebespezifischer <i>serpent</i> Knockdown	51
5.1.5.	Serpent-Bindung in den intronischen Enhancern von <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i>	55
5.1.6.	Ektopische Serpent Expression aktiviert <i>Laminin</i> Genexpression	57
5.2.	Nidogen beeinflusst die Fertilität	59
5.2.1.	Nidogen ist hoch konserviert	59
5.2.2.	Expression von <i>Nidogen</i>	59
5.2.3.	Komposition der Basallamina in <i>Nidogen</i> Mutanten	62
5.2.4.	Vitalität von <i>Nidogen</i> Mutanten	64
5.2.5.	<i>Nidogen</i> Mutanten zeigen verminderte Fertilität	66
5.3.	Die Rollen von Matrix Metalloproteinasen für die ECM-Remodellierung während der Metamorphose	71
5.3.1.	ECM Degradierung und Mmp Lokalisation während der Metamorphose	71
5.3.2.	Expression von Mmps während der Metamorphose	73
5.3.3.	Letalität von <i>Mmp</i> Allelen	73
5.3.4.	<i>Mmp2</i> Knockdown während der Metamorphose	74
<b>6. Diskussion</b>		<b>78</b>
6.1.	Laminin wird gewebespezifisch exprimiert	78
6.2.	Serpent ist der wichtigste Regulator für <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i>	79
6.3.	Nidogen ist nicht essentiell für die Assemblierung der Basallamina	82
6.4.	<i>Nidogen</i> Mutanten zeigen eine verminderte Fertilität	84
6.5.	Spezifische Rollen von Mmps	85
<b>7. Literaturverzeichnis</b>		<b>89</b>
<b>8. Internetressourcen</b>		<b>101</b>
<b>9. Versicherung</b>		<b>102</b>
<b>10. Danksagung</b>		<b>103</b>
<b>11. Appendix</b>		<b>104</b>

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	10
Tabelle 2: Verwendete Reagenziensätze	11
Tabelle 3: Verwendete Größenstandards	12
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper	12
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper	13
Tabelle 6: Verwendete Seren	14
Tabelle 7: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	14
Tabelle 8: Verwendete Einbettungsmedien und Immersionsöl	14
Tabelle 9: Verwendete Enzyme und Puffer	15
Tabelle 10: Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung von Drosophila-DNA	15
Tabelle 11: Verwendete Primer zur ChIP-qPCR	15
Tabelle 12: Verwendete plasmidspezifische Primer zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung	16
Tabelle 13: Verwendete Vektoren	16
Tabelle 14: Verwendete Bakterienstämme	16
Tabelle 15: Reporterlinien	16
Tabelle 16: Mutanten	17
Tabelle 17: GAL4-Linien	17
Tabelle 18: UAS-Linien	17
Tabelle 19: Defizienz-Linien	18
Tabelle 20: Balancer-Linien	18
Tabelle 21: Verwendete Software	18
Tabelle A1: Spezies und entsprechende Orthologe mit benutzten Ndg Aminosäuresequenzen	106
Tabelle A2: Letalität von Mmp Allelen	107

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des beispielhaften Aufbaus einer Basallamina.	5
Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Laminin Heterotrimeren und deren Sekretionsweg.	6
Abbildung 3: Schema der Proteininteraktionen von Nidogen.	7
Abbildung 4: Schema der Mmp Prozessierung und Sekretion.	8
Abbildung 5: Embryonale Expression von <i>Laminin B1</i> Reporter-gen-Konstrukten.	45
Abbildung 6: Embryonale Expression von <i>Laminin B2</i> Reporter-gen-Konstrukten.	46
Abbildung 7: Die gewebespezifische Laminin-Sekretion reicht für eine frühe embryonale ECM aus.	47
Abbildung 8: Proteinverteilung von Perlecan und Kollagen IV in Abwesenheit von Hämocyten.	49
Abbildung 9: Genomischer Locus von <i>Laminin B1</i> mit Reporter-genkonstrukten und vorhergesagten TFBSs.	50
Abbildung 10: Genomischer Locus von <i>Laminin B2</i> mit Reporter-genkonstrukten und vorhergesagten TFBSs.	51
Abbildung 11: Reporter-gen-Expression in <i>serpent</i> Mutanten und <i>serpent</i> Knockdown in Mitteldarmprimordien.	53
Abbildung 12: Myocyte enhancer factor 2 bindet im 5' Bereich der IE von <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i> .	54
Abbildung 13: ChIP-qPCR deckt <i>Serpent</i> Bindestellen in CRM von <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i> auf.	56
Abbildung 14: Myogene <i>Serpent</i> Expression führt zur ektopischen Laminin Reporter-gen-Aktivierung und gestörter Myogenese.	58
Abbildung 15: Proteinstruktur von Nidogen und Konservierung der Domänen.	59
Abbildung 16: Expressionsanalyse von <i>Nidogen</i> Allelen.	61
Abbildung 17: ECM-Komposition der viszeralen Muskulatur in <i>Nidogen</i> Mutanten.	63
Abbildung 18: Letalität von <i>Nidogen</i> Mutanten zu verschiedenen Entwicklungszeiten.	65
Abbildung 19: Fertilitätstest an <i>Nidogen</i> Mutanten.	67
Abbildung 20: Nidogen Proteinverteilung in Ovarien und Testes.	68
Abbildung 21: Kollagen Verteilung und Morphologie von <i>Nidogen</i> Mutanten im Ovar.	69
Abbildung 22: Proteinverteilung von Mmp1, Mmp2 und Laminin B1 während der Metamorphose.	72
Abbildung 23: Expression von <i>Mmps</i> .	73
Abbildung 24: Letalität nach <i>Mmp2</i> Knockdown während der Metamorphose.	75
Abbildung 25: <i>Mmp2</i> Phänotyp des Mitteldarms.	76
Abbildung 26: ECM Komposition nach <i>Mmp2</i> Knockdown.	77
Abbildung 27: Schema der frühen und differenzierten ECM.	79
Abbildung 28: Schema der transkriptionellen Regulation von <i>Laminin B1</i> und <i>Laminin B2</i> .	80
Abbildung 29: Rolle der <i>Mmps</i> für den Abbau der ECM und die Remodellierung von Geweben.	88
Abbildung A1: Vektorkarte des pGEM-T-Easy-Vektors.	104
Abbildung A2: Vektorkarte des pGreen H Pelican-Transformationsvektors.	104
Abbildung A3: Proteinlokalisierung von <i>serpent::GFP</i> und Sonifizierungskontrolle des ChIP-Inputs.	105
Abbildung A4: Myogene <i>Serpent</i> Expression führt zur ektopischen <i>Laminin B2</i> Reporter-gen-Aktivierung und gestörter Myogenese.	105
Abbildung A5: Testis von <i>Nidogen</i> Mutanten.	107
Abbildung A6: <i>Mmp</i> Letalität in verschiedenen Larvenstadien.	107
Abbildung A7: Letalitätstest nach <i>Mmp2</i> Knockdown.	108
Abbildung A8: <i>Mmp2<sup>lacZ</sup></i> Phänotyp.	109

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein Netzwerk aus Proteinen, die sich im interzellulären Raum mit Zelloberflächenproteinen verknüpfen und so für die Stabilität von Geweben und Organen sorgen. ECM-Komponenten sind an Zellmigration, Differenzierung von Geweben oder auch an Signalwegen beteiligt. Bisherige Studien zeigen, dass an der Ausbildung einer ECM die hoch konservierten Komponenten Laminin, Perlecan, Nidogen, Kollagen IV und Kollagen XV/XVIII beteiligt sind. Dabei assemblieren sekretierte Laminin Heterotrimeren durch Bindung an Zelloberflächenrezeptoren zu einem Laminin-Netzwerk. Die Linkerproteine Nidogen und Perlecan binden an dieses Netzwerk und ermöglichen die Bindung von Kollagenen (Hohenester and Yurchenco, 2013; Hynes, 2009).

Die Genregulation von ECM-Komponenten wurde bisher nur wenig untersucht, da man von einer Selbstassemblierung der ECM Proteine an der Zelloberfläche und einer Interaktion mit ihren Bindepartnern ausging, die unabhängig von ihrem Expressionsort abläuft. Die transkriptionelle Genregulation von Laminin-Untereinheiten in verschiedenen Geweben ist ein entscheidender Schritt für das Verständnis der Assemblierung von ECM *in vivo*. Durch Reporteranalysen konnte eine gemeinsame Expression von *Laminin B1 (LanB1)* und *Laminin B2 (LanB2)* in frühen mesodermalen Zellen, in entodermalen und ektodermalen Darmprimordien sowie im Dotter und der Amnioserosa gezeigt werden. Somit scheinen Gewebe aus allen Keimblättern die Möglichkeit zu besitzen eine frühe gewebespezifische ECM selbst zu initiieren, die als Voraussetzung späterer Sekretion von Hämozyten und dem Fettkörper dienen könnte. Embryonen mit komplettem Verlust der Hämozytensekretion besitzen eine Laminin-haltige ECM, welche alle embryonalen Gewebe umhüllt und für die frühe Ausbildung der Gewebe ausreicht, allerdings nicht für die finale Differenzierung. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beide untersuchten Laminin Gene durch *cis*-regulatorische Elemente in den großen intronischen Enhancern kontrolliert werden. In Abwesenheit des GATA-Faktors Serpent (Srp) ist die Laminin Reporterexpression stark reduziert, was die Abhängigkeit des Großteils des Laminin Expressionsmuster von Srp Aktivität zeigt. Die direkte Bindung von Srp in den intronischen Enhancern von *LanB1* und *LanB2* konnte mittels ChIP-qPCR nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigt ektopisch exprimiertes Srp in Muskelzellen eine Aktivierung der *LanB1* und *LanB2* Enhancerelemente in somatischen Muskeln. Diese Resultate zeigen eine übergreifende Rolle von Srp für die Laminin Regulation in den Geweben und Keimblättern von *Drosophila*.

Die Rolle von Nidogen (Ndg) wurde für die Verlinkung zwischen dem Laminin- und dem Kollagen-Netzwerk und der damit verbundenen Assemblierung der ECM interpretiert. Dementsprechend ist auch die Ndg Proteinsequenz von *Drosophila* in der vergleichenden phylogenetischen Analyse hoch konserviert, was mit der Zuordnung zum so genannten „*basement membrane toolkit*“ einhergeht. Trotzdem sind hypomorphe und auch amorphe *Ndg* Mutanten lebensfähig und zeigen darüber hinaus keine Differenzierungsstörungen von Geweben, wie es bei Verlust von allen anderen Komponenten des „*basement membrane toolkit*“ der Fall ist. Die darauffolgende Analyse der ECM-Komposition in *Ndg* Mutanten zeigt widersprüchliche Ergebnisse zu der bisher postulierten Rolle von Ndg als essentiellem Bindeglied zwischen den Laminin- und Kollagen-Netzwerken, da die Komponenten der Basallamina unverändert vorhanden sind. Ein Letalitätstest mit zunehmendem Alter der Elterntiere lässt zunächst auf eine altersabhängig steigende embryonale Letalität schließen, die mit fehlender

Befruchtung in Zusammenhang gebracht werden konnte. Diese verminderte Fruchtbarkeit konnte sowohl auf verringerte Fertilität der Männchen wie auch der Weibchen zurückgeführt werden. In anschließenden Analysen konnte eine Rolle von *Ndg* in der Oogenese gezeigt werden, die auf einen Defekt in der Stammzellerneuerung oder auf physiologische Defekte hinweist. Die Ergebnisse zeigen, dass *Ndg* nicht für die Assemblierung der Basallamina verantwortlich ist, sondern eine wichtige Funktion für die reproduktive Fitness zeigt.

Der Abbau von ECM wird über Matrix Metalloproteinasen (*Mmps*) realisiert. Dabei konnte in vorherigen Studien schon eine entscheidende Rolle beider in *Drosophila* existierenden *Mmp* Gene für die Entwicklung gezeigt werden und darüber hinaus auch Unterschiede in der Substratspezifität (Jia et al., 2014; Page-McCaw et al., 2003). Die Analyse der Proteinverteilung während der Metamorphose deutet auf abweichende Rollen für die Degradierung und Remodellierung der ECM hin. Während *Mmp1* eher im extrazellulären Raum agiert und auch auf histolysiertem Material zu detektieren war, konnte *Mmp2* zu den Zeitpunkten an Membranen lokalisiert werden, wenn die ECM im starken Maße abgebaut wird. Durch Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass *Mmp1* unter anderem Enhanceraktivität in Hämocyten aufzeigt, während *Mmp2* in den Geweben exprimiert wird, in denen ECM degradiert bzw. remodelliert werden muss. Durch einen Knockdown von *Mmp2* konnte eine für die Entwicklung entscheidende Rolle während der Metamorphose gezeigt werden. Der Verlust von *Mmp2* führt zu fehlerhafter Kontraktion der viszeralen Muskulatur und einer unvollständigen Histolyse des larvalen Mitteldarms. Durch Analyse der ECM Komposition nach Knockdown von *Mmp2* konnte gezeigt werden, dass Proteine der Basallamina an der viszeralen Muskulatur von *Mmp2* degradiert werden. Die starke Expression in Hämocyten und die Proteinverteilung im extrazellulären Raum von *Mmp1* sowie die gewebespezifische Expression und die membranständige Proteinlokalisierung von *Mmp2* deuten auf unterschiedliche Rollen der *Mmps* für den Ablauf der ECM Remodellierung während der Metamorphose hin.

## 1.2. Summary

The extracellular matrix (ECM) is a network of proteins located in the intercellular space which interact with cell surface proteins and provides for tissue- and organ-stability. ECM components are involved in cell migration, tissue-differentiation and signaling pathways. Recent studies have shown that the highly conserved components Laminin, Perlecan, Nidogen, Kollagen IV and Kollagen XV/XVIII are involved in matrix assembly. Thereby, secreted Laminin heterotrimer self-assemble at the cell surface via interaction with receptors into a Laminin network. The linker proteins Perlecan and Nidogen bind to this network and allow binding of Collagen (Hohenester and Yurchenco, 2013; Hynes, 2009).

Gene regulation of extracellular matrix (ECM) components is poorly understood due to the assumption that ECM proteins self-assemble at the cell surface independent of their origin and subsequently interact with their binding partners. Therefore, elucidating transcriptional regulation of Laminin expression in distinct tissues represents a key step in our understanding of ECM assembly *in vivo*. Here we show that *Laminin B1 (LanB1)* and *Laminin B2 (LanB2)* share common expression patterns in early mesodermal cells, in endodermal and ectodermal gut primordia, but also in the yolk compartment and amnioserosa, suggesting that every germ layer has the property to initiate an early tissue-specific ECM by itself as an essential prerequisite for later secretion of Laminins by hemocytes and fat body cells. Indeed, embryos with complete loss of hemocyte secretion reveal a Laminin-containing ECM that surrounds all embryonic tissues and seems to be sufficient for early tissue formation, but is unable to elicit their final differentiation. Further, we demonstrate that both Laminin genes are controlled by *cis*-regulatory modules (CRMs) for their tissue-specific secretion, which are located in the large intronic enhancers. In the absence of the GATA-transcription factor Serpent (Srp), Laminin reporter gene expression was strongly limited, indicating that a majority of the Laminin expression pattern depends on Srp activity. Using ChIP-qPCR, we were able to demonstrate a direct binding of Srp to the intronic enhancers of *LanB1* and *LanB2*. In addition, ectopically expressed myogenic Srp activated the enhancer elements of *LanB1* and *LanB2* in somatic muscles. Our results confirm Srp as an overarching regulator of Laminin expression in the tissues and germ layer of *Drosophila*.

The role of Nidogen (Ndg) was postulated as essential crosslinker between Laminin and Collagen networks and therefore for ECM assembly. The amino acid sequence of *Drosophila* Ndg is highly conserved across phylogeny which is consistent with the affiliation to the so called "basement membrane toolkit". However, hypomorphic and amorphic *Ndg* mutants are viable and moreover, do not show any failure of tissue differentiation, which is the case in every other loss of a component of the "basement membrane toolkit". The following analysis of ECM composition in *Ndg* mutant background reveals conflicting results to the postulated role of Ndg as essential crosslinker between Laminin and Collagen networks. The essential components of the basement membrane are unaltered. A lethality test with an increasing age of parental flies indicate an age dependent increase of embryonic lethality, but could also be explained with a loss of fecundity, which could be assigned to a decrease of fertility of female and male. So, it could be shown, that Ndg play a role in oogenesis, which indicates a defect in stem cell proliferation or tissue physiology. These results show that Ndg is not essential for overall assembly of the basement membrane, instead, it plays an import role in reproductive fitness.

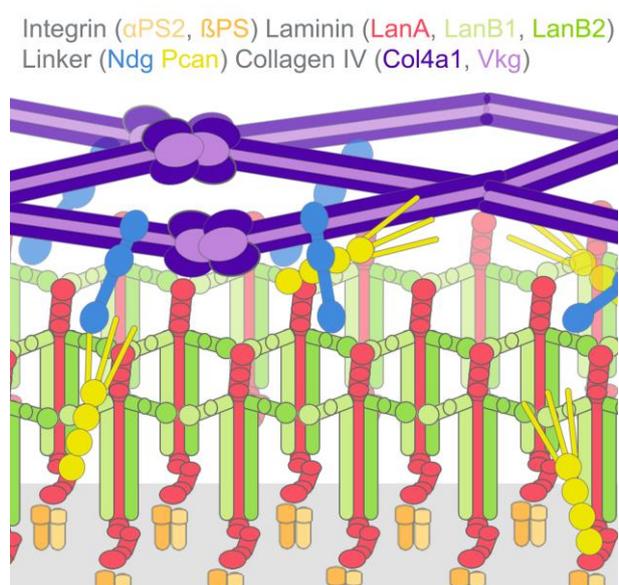
Degradation of ECM depends on Matrix Metalloproteases (Mmps). Recent studies have shown a critical role for both *Drosophila Mmp* genes for development and moreover, differences between

substrate specificity (Jia et al., 2014; Page-McCaw et al., 2003). Analysis of protein distribution during metamorphosis point to distinct roles for ECM degradation and remodeling. Mmp1 seems to act extracellular and could be detected in histolysed material, while Mmp2 is localized at the membrane during intense ECM degradation. Expression analyses show strong enhancer activity of *Mmp1* in hemocytes and enhancer activity of *Mmp2* in tissues, which are under ECM remodeling respective degradation. A time-specific knockdown of *Mmp2* during metamorphosis reveals an essential role of *Mmp2* for development during metamorphosis. Mmp2 is needed for contraction of visceral muscles and histolysis of larval midgut epithelium. Analysis of *Mmp2* Knockdown show, that proteins of the basement membrane of the visceral musculature are degraded by Mmp2. The strong *Mmp1* expression pattern in hemocytes, the extracellular protein distribution and the strong tissue-specific expression and membrane associated protein distribution of Mmp2 indicate distinct roles of *Mmps* for ECM remodeling during metamorphosis.

## 2. Einleitung

### 2.1. Der Aufbau der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist essentiell für den Aufbau multizellulärer Organismen. Sie schützt Organe vor mechanischen und chemischen Reizen, ist an der Zellpolarität sowie an der Zellmigration beteiligt und spielt für die Bindung von Morphogenen und Wachstumsfaktoren eine Rolle (Humphrey et al., 2014; Hynes, 2009). Die Variabilität und Komplexität einer ECM wird durch die hohe Anzahl an Genen reflektiert, die für ECM oder ECM-assoziierte Proteine codieren. Das so genannte „Matrisom“ umfasst hierbei über 1000 Gene (Hynes and Naba, 2012; Martin et al., 1984; Naba et al., 2016). Dabei ist die Assemblierung dieser komplexen ECM von der Interaktion einiger weniger Komponenten abhängig. Das „*basement membrane toolkit*“ beschreibt die miteinander interagierenden Komponenten, die während der Evolution der meisten Metazoen erhalten blieben und hoch konserviert sind (Hynes, 2012; Whittaker et al., 2006; Yurchenco, 2011). Die grundlegende Struktur der Basallamina besteht aus zwei Netzwerken, einem Laminin- und einem Kollagen Typ IV-Netzwerk, die über die Linker-Proteine Nidogen und Perlecan miteinander verknüpft sind (Yurchenco, 2011). An diesem Gerüst sind zusätzlich Kollagen XV/XVIII Orthologe assoziiert. In *Drosophila* codieren lediglich neun Gene für Proteine des „*basement membrane toolkit*“ (Hynes, 2012). Davon codieren vier Gene für Laminin-Untereinheiten (zwei  $\alpha$ -Untereinheiten mit *Laminin A/LanA* und *Laminin wing blister/wb*; eine  $\beta$ -Untereinheit mit *Laminin B1/LanB1* und eine  $\gamma$ -Untereinheit mit *Laminin B2/LanB2*), zwei für Typ IV Kollagene (*Collagen type IV alpha 1/Col4a1* und *viking/vkg*) und ein Gen für ein Typ XV/XVIII Homolog (*Multiplexin/Mp*). Jeweils ein Gen codiert für die Linker-Proteine Nidogen (Ndg) und Perlecan (Pcan), welches durch *terribly reduced optic lobes (trol)* codiert wird (Borchiellini et al., 1996; Dai et al., 2018; Datta and Kankel, 1992; Friedrich et al., 2000; Henchcliffe et al., 1993; Martin et al., 1999; Meyer and Moussian, 2009; Montell and Goodman, 1988, 1989; Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012; Wolfstetter et al., 2019; Yarnitzky and Volk, 1995; Yurchenco, 2011).

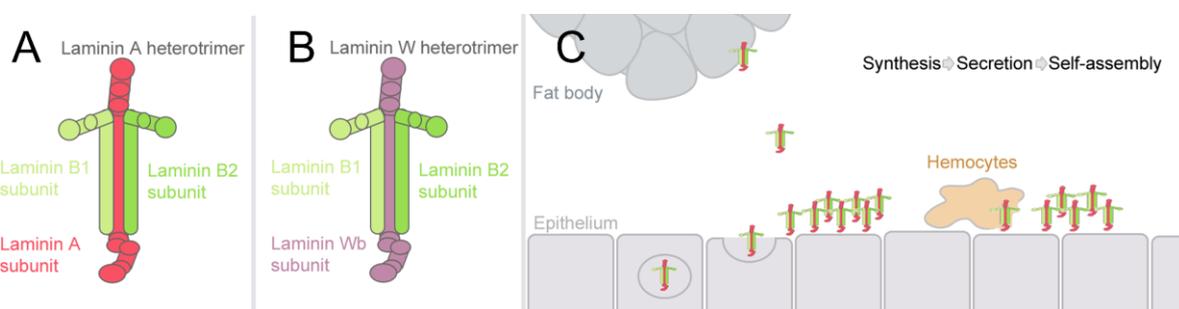


**Abbildung 1: Schema des beispielhaften Aufbaus einer Basallamina.** Alle Basallaminae bestehen aus den hoch konservierten Komponenten: Laminin Heterotrimere (hier LanA in rot, LanB1 in hell-grün, LanB2 in grün) und interagieren mit Zelloberflächenrezeptoren wie beispielsweise Integrin Heterodimeren (Beispiel:  $\alpha$ PS2 in hellorange,  $\beta$ PS in orange). Dieses Laminin-Netzwerk ist über die Linkerproteine Nidogen (Ndg in blau) und Perlecan (Pcan in gelb) an das Kollagen IV-Netzwerk verknüpft. Kollagen IV polymerisiert aus je zwei  $\alpha$ 1- und einer  $\alpha$ 2-Untereinheit (Col4a1 in violett, Vkg in hellviolett). Kombiniert nach: Engel and Chiquet, 2011; Hohenester and Yurchenco, 2013; Kefalides and Borel, 2005a, 2005b.

## 2.2. Die initiale Assemblierung der extrazellulären Matrix durch Laminin

Laminine als heterotrimere Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) bilden die Hauptbestandteile von Basallaminae (Bl). Diese Proteine selbst-assemblieren in ein zellassoziertes Netzwerk und interagieren dabei mit Zelloberflächenrezeptoren, wie Integrinen und anderen ECM-Komponenten. Laminin Heterotrimere bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), welche eine kreuzförmige Struktur ausbilden und im Genom von *Drosophila melanogaster* von nur vier Genen codiert werden (Hohenester and Yurchenco, 2013; Timpl and Brown, 1996). Jedes Heterotrimer durchläuft eine initiale Dimerisierung der  $\beta$ -,  $\gamma$ -Untereinheiten über Disulfid-Brückenbindung, eine anschließende Inkorporation der  $\alpha$ -Untereinheit, gefolgt von Sekretion und der finalen Bindung an die Zelloberfläche (Goto et al., 2001; Kumagai et al., 1997; Morita et al., 1985; Peters et al., 1985). Dort führen Laminine diverse Funktionen in Organismen aus, welche von Zell-Adhäsion über Migrationsprozesse reichen (Schöck et al., 2003; Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012). Experimente an Säugetierzellkulturen zeigen, dass  $\alpha$ -Untereinheiten alleine sekretiert werden können, während  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten eine simultane Expression für ihre Sekretion benötigen (Yurchenco et al., 1997), was ein Indiz für gemeinsame Regulationsmechanismen darstellt. Darüber hinaus zeigt der Verlust der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheit die Abhängigkeit der jeweiligen Einzelproteine für die Sekretion des kompletten Laminin Heterotrimers (Petley-Ragan et al., 2016; Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012).

Laminin-Untereinheiten werden bereits in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert, ein Verlust der beiden, essentiellen  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheiten führt allerdings erst spät zu Phänotypen in Darm, Tracheen, Muskulatur und Nervensystem (Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012). Komplettverluste von *LanA* und *LanWb* resultieren ebenso in embryonaler Letalität mit Defekten in der somatischen Muskulatur, im Herz und im Mitteldarmepithel (Henchcliffe et al., 1993; Yarnitzky and Volk, 1995). In hypomorphen Allelen beider Gene konnte zudem für *LanWb* eine Rolle in der Ausbildung der Flügel, sowie für *LanA* eine Rolle in der Oozytenentwicklung und der Wegfindung von Pionieraxonen im ZNS nachgewiesen werden (Deng and Ruohola-Baker, 2000; Garcia-Alonso et al., 1996; Martin et al., 1999).

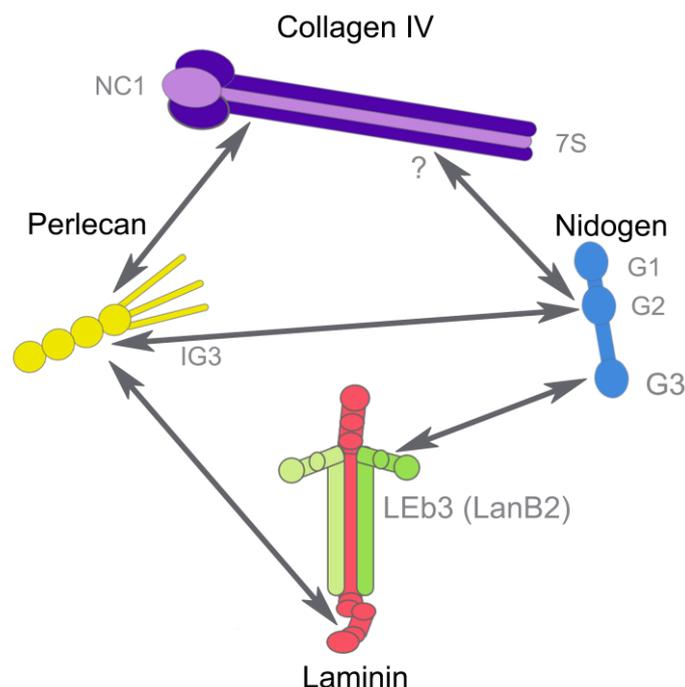


**Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Laminin Heterotrimeren und deren Sekretionsweg. (A)** Aufbau des LanA-Heterotrimers aus LanA (rot), LanB1 (hellgrün) und LanB2 (grün) Untereinheiten. **(B)** Aufbau des LanWb-Heterotrimers aus LanWb (violett), LanB1 (hellgrün) und LanB2 (grün) Untereinheiten. **(C)** Laminine werden nach der Synthese und den folgenden Di- und Trimerisierungen als Heterotrimere sekretiert. An der Zelloberfläche selbst-assemblieren sie über Bindung an Zelloberflächenrezeptoren. Je eine der N-terminalen globulären Domänen jeder Untereinheit bindet mit den jeweils anderen Untereinheiten. Neben der zellautonomen Laminin-Sekretion findet sich für Fettkörper und Hämocyten nicht zellautonome Laminin-Sekretion. Nach: Cognato and Yurchenco, 2000; Hohenester and Yurchenco, 2013; Yurchenco, 2011.

### 2.3. Die Verlinkung der extrazellulären Matrix durch Nidogen

Nidogen ist ein aus drei globulären Domänen und einer *rod-like* Domäne bestehendes Sulfat-Glykoprotein (Carlin et al., 1981; Fox et al., 1991). Entscheidend für die Inkorporation in die ECM ist dabei die Bindung der globulären G3 Domäne an die Laminin  $\gamma$ -Untereinheit (in *Drosophila* LanB2), während weitere Quervernetzungen über die G2 Domäne mit Kollagen IV und Perlecan ermöglicht werden (Durkin et al., 1988b; Fox et al., 1991; Hopf et al., 2001; Mann et al., 1989; Reinhardt et al., 1993). Im Kontext der Interaktionen von Nidogen mit dem Laminin- sowie dem Kollagen-Netzwerk wurde deshalb eine wichtige Rolle für die Vernetzung und damit des Aufbaus der BI postuliert (Aumailley et al., 1993; Ho et al., 2008; Mayer et al., 1993, 1995).

Die Analysen von *Ndg1* Mutanten in Mäusen zeigten neurologische Phänotypen (Dong et al., 2002; Murshed et al., 2000; Schymeinsky et al., 2002) und Doppelmutanten führten durch Beeinträchtigung der Herz- und Lungenentwicklung zu perinataler Letalität (Bader et al., 2005; Böse et al., 2006). Zudem wurde in *C. elegans* eine Rolle für die Organisation von neuromuskulären Verbindungen durch Ndg beschrieben, deren Verlust ebenfalls zu neurologischen Defekten sowie zu Infertilität führt (Ackley et al., 2003; Kang and Kramer, 2000). Analysen der Zebrafiscentwicklung von *D. rerio* zeigen darüber hinaus eine Rolle im Größenwachstum, da Ndg Mutanten eine verringerte durchschnittliche Körperlänge zeigen (Zhu et al., 2017). Allerdings konnte die bisher postulierte Rolle von Ndg für die Assemblierung von ECM Proteinen nie nachgewiesen werden. Während in Vertebraten zwei oder mehr Gene für *Ndg* codieren, gibt es in *Drosophila* nur ein *Ndg* Gen, wodurch die Folgen von *Ndg* Funktionsverlust einfacher analysierbar werden.



**Abbildung 3: Schema der Protein-Interaktionen von Ndg.** Ndg bindet mit seiner dritten globulären Domäne (G3) an die LEB3 Domäne der LanB2-Untereinheit und außerdem mit der zweiten globulären Domäne (G2) sowohl an Kollagen IV als auch über die IG3 Domäne an Perlecan. Neben Ndg kann auch Perlecan sowohl an Laminin Heterotrimere wie auch an Kollagen IV binden. Nach: Aumailley et al., 1989; Fox et al., 1991; Mayer et al., 1995, 1997; Reinhardt et al., 1993; Timpl and Brown, 1996.



## 2.5. Vorangegangene Arbeiten und Aufgabenstellung

Basallaminae (Bl) bestehen aus zwei unterschiedlichen Netzwerken, die durch Selbstassemblierung der jeweiligen Komponenten Laminin und Kollagen IV entstehen und mit den Linkerproteinen Perlecan und Nidogen miteinander verknüpft sind. Unterschiedliche Kompositionen von ECM-Netzwerken wurden dabei schon detailliert analysiert. Allerdings wurde die Genregulation der für die Assemblierung essentiellen Komponenten kaum beachtet. Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der Annahme das extrazelluläre Matrixproteine unabhängig von ihrem Ursprung am Bestimmungsort von selbst assemblieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression der *Laminin B1* und *Laminin B2* (*LanB1* und *LanB2*) Untereinheiten und deren Genregulation untersucht. Dabei sollte die vergleichende transkriptionelle Analyse der beiden Gene Aufschluss darüber geben, welche Gewebe im *Drosophila* Embryo über die Potenz verfügen, ein initiales Laminin-Netzwerk zu sekretieren. Durch Verlust und Überexpressionsstudien sollte die Genregulation von *LanB1* und *LanB2* mittels Laminin-Reporterlinien untersucht und mit ergänzenden Analysen die direkte Bindung von regulativen Transkriptionsfaktoren getestet werden.

Da das Linkerprotein Nidogen (Ndg) das Laminin- mit dem Kollagen-Netzwerk verbindet, wurde ihm eine Rolle für die Assemblierung der ECM zugeschrieben. Studien in Vertebraten und *C. elegans*, zeigten dagegen nur schwache, nicht letale Phänotypen. Deshalb sollte die Analyse des einzigen *Ndg* Gens in *Drosophila* Aufschluss über die eigentliche Funktion geben und dabei die zuvor postulierte Rolle überprüft werden. Dazu wurden neu generierte *Ndg* Mutanten (Wolfstetter et al. 2019) genutzt, um die Komposition der Bl in Abwesenheit von Ndg zu analysieren. Durch Letalitätsanalysen von verschiedenen Entwicklungsstadien sollte die Rolle von Ndg für die Entwicklung beschrieben werden und darauf aufbauend die Auswirkung des Ndg-Verlustes auf Differenzierung und Morphogenese von Geweben und Organen analysiert werden.

Die für die Degradierung von ECM Komponenten essentiellen Matrix Metalloproteinasen (Mmps) haben in *Drosophila* und anderen Organismen redundante und spezifische Rollen für die Remodellierung von ECM und Geweben. Während der Metamorphose werden die meisten Gewebe von *Drosophila* abgebaut und neu gebildet. Die viszerale Muskulatur persistiert über die Metamorphose und eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass das Linkerprotein Perlecan ab- und wieder aufgebaut wird. In dieser Arbeit sollte die spezifische Rolle der beiden in *Drosophila* existenten Mmps für die Remodellierung der ECM während der Metamorphose anhand des Mitteldarms analysiert werden. Hierzu sollte die vergleichende Genexpression sowie die Proteinlokalisierung Einblick über die Degradationsprozesse geben und ein zeitspezifischer Knockdown während der Metamorphose die Auswirkung von Mmp Verlust aufzeigen.

## 3. Material

### 3.1. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen:

#### 3.1.1. Allgemeiner Laborbedarf

Carl Roth; Werkstatt Allg. Zoologie, JLU

#### 3.1.2. Stammhaltung *Drosophila melanogaster*

Greiner-One; 3M Deutschland; Macherey-Nagel; Werkstatt Allg. Zoologie, JLU

#### 3.1.3. Chemikalien

Carl Roth; Merck; Sigma-Aldrich Chemie

### 3.2. Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer sind für jede Methode angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Masse einer Festsubstanz (in g) gelöst pro 100 ml Lösungsmittel (w/v) oder auf den Anteil einer Flüssigkeit (in ml) in 100 ml Lösungsvolumen (v/v). Alle Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser (Typ 1 Reinheitsgrad, Millipore-Aufbereitung von einfach entionisiertem Wasser) hergestellt.

### 3.3. Geräte

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Gerät	Modell	Bezugsquelle
Analysenwaage	Sartorius CP 1245	Sartorius, Göttingen
Autoklaven	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systech
	Tuttnauer Systec 3850 ELV	Systech
Binokulare	M5-71585	Wild Heerbrugg
Beleuchtungssystem	Schott KL 1500 LCD	Schott
CO <sub>2</sub> -Anästhesierer		Werkstatt, Universität Gießen
Digitalkamera	SIS-CC 12	Olympus SIS, Münster
	SIS-VC 12	Olympus SIS, Münster
Eismaschine	DP74	Olympus SIS, Münster
	Scotsman AF100	Enodis
Elektrophoresekammer	Model 40-0708	PEQLAB, Erlangen
	Model 40-1214	PEQLAB, Erlangen
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Perfect Blue Twin S	PEQLAB, Erlangen
Elektrophoresenetzgerät	Consort E 835 300 V-500 mA	Consort nv, Turnhout, Belgien
Fluoreszenzbinokular	MSV 269	Leica
Fotomikroskop	Olympus BX 41	Olympus, Hamburg
	Olympus BX 51	Olympus, Hamburg
	Olympus BX 53	Olympus, Hamburg
Geldokumentation	E-Box Videosysteme	PEQLAB, Erlangen
Heizblock	Rotilabo-Block-Heater H 250	Carl Roth, Karlsruhe
	HB-LS1H VLM	Laborshop, Leopoldshöhe
Hybridisierungsöfen	Compact Line OV4	Biometra
	Shake 'n' stack	Thermo Fisher Scientific

Inkubator	diverse Modelle	Memmert
Konfokales Laser- Scanning- Mikroskop	Leica TCS SP2 AOBS	Leica Microsystems
Kryostat	Leica CM 1950	Leica Microsystems
Magnetheizrührer	MBT Brand Model L-81	Micro-Bio-Tec-Brand
Magnetrührer	MBT Brand Model L-71	Micro-Bio-Tec-Brand
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Holten Save 2010	Holten Save 2010,
Mikrowelle	Severin Mikrowave 800	Severin Elektrogeräte
Netzgeräte	E 835	Consort
	P25 Standard Power Pack	Biometra
pH-Meter	pH/ORP Elektrode HI 211 0	Hanna Instruments
Pipetten	Pipetman Classic (div. Modelle)	Gilson
Präzisionswaage	Sartorius BL 310	Sartorius, Göttingen
Real-time Thermocycler	CFX96	BIO-RAD
Schüttler	Heidolph Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
	Certomat R	Sartorius, Göttingen
Semi-Dry Blotter	Phero-Comet	Biotec Fischer
Thermocycler	Cyclone 25	PEQLAB, Erlangen
	Cyclone Gradient	PEQLAB, Erlangen
	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Ultraschalleinheit	Branson-S250	Branson
Vortexer	MBT Brand L 46	Micro-Bio-Tec-Brand, Gießen
	Vortex-Genie 2 Digital	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad	Julabo HC-4/10 Julabo	Labortechnik, Seelbach
Wasseraufbereitungssystem	Millipore SimplicityTM	Water Millipore Corporation, USA
Weinkühlschrank	Klarstein Botella 120S	Klarstein
Zentrifugen	Hettich Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
	Hettich Mikro 20	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
	Centrifuge 5415C	Eppendorf

### 3.4. Reagenziensätze

**Tabelle 2: Verwendete Reagenziensätze**

Reagenzien	Hersteller
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England Biolabs
SYBR Green Master Mix	Bio-Rad
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
ISOLATE II PCR and Gel Kit	Bioline
Fast Plasmid Minikit	5 Prime
Jetstar Plasmid Kit 2.0	Genomed
Midi Gene JET Plasmid Midiprep Kit	Thermo Scientific
pGEM-T Easy Vector Systems	Promega
DIG RNA Labeling Mix	Roche
Vectastain Elite, ABC-Standard-Kit	Vector Laboratories

RiboSafe RNase Inhibitor	Bioline
--------------------------	---------

### 3.5. Größenstandards

**Tabelle 3: Verwendete Größenstandards**

Größenstandard	Hersteller
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs
HyperLadder 100 bp	Bioline
HyperLadder 1 kb	Bioline
HyperPage	Bioline

### 3.6. Medien zur Stammhaltung von *Drosophila melanogaster*

#### **Maismehlagar**

6.6 % (w/v) Maismehl, 4.7 % (w/v) Kristallzucker, 1.7 % (w/v) Trockenhefe, 0.75 % (w/v) Agar-Agar (dänisch pulverisiert), 0.6 % (v/v) Rübensirup, 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. Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Herstellung von Bakterien-Medien wurde entionisiertes Wasser aus der Anlage, Institut für allgemeine und spezielle Zoologie, genutzt. Die Medien wurden bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert und vor der Nutzung mit entsprechender Menge Ampicillin versetzt.

#### **LB Medium**

1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 85,5 mM NaCl pH 7,0

#### **LB Agar**

1,5 % (w/v) Agar-Agar (hochrein), 1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 85,5 mM NaCl pH 7,0

#### **SOB-Medium** (Hanahan, 1983)

2 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> pH 7,0

#### **SOC-Medium** (Hanahan, 1983)

SOB-Medium, autoklaviert, 20 mM Glucose

### 3.8. Antikörper und Seren

#### 3.8.1. Primärantikörper

**Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper**

Name, (Abk.), (Referenz)	Art, Verdünnung	Bezugsquelle
Anti Collagen IV, (Coll), (Urbano et al., 2009)	Meerschweinchen, 1:500	Maurice Ringuette (University of Toronto)
Anti Digoxygenin FAB Fragment, Alkalische Phosphatase konjugiert	Schaf, 1:4000	Roche

Anti Fasciclin II (FasII), (Bastiani et al., 1987)	Maus, 1:5	Christian Klämbt (Westfälische-Willhelms- Universität Münster)
Anti Fasciclin III (FasIII), (Patel et al., 1987)	Maus, 1:10	Christian Klämbt (Westfälische-Willhelms- Universität Münster)
Anti $\beta$ -Galaktosidase, ( $\beta$ GAL)	Kaninchen, 1:2500	Cappel
Anti Green Fluorescent Protein, ab290, (GFP)	Kaninchen, 1:500 (IH), 1:500 (ChIP)	Abcam
Anti Green Fluorescent Protein (7.1 + 13.1), (GFP)	Maus, 1:500	Sigma-Aldrich
Anti Laminin A, (LanA), (Yarnitzky and Volk, 1995)	Meerschweinchen, 1:500	Thalia Volk (Weizmann Institute of Science)
Anti Laminin B1 (LanB1), (Kumagai et al., 2000)	Kaninchen, 1:500	Abcam
Anti Laminin B2, (LanB2), (Kumagai et al., 2000)	Kaninchen, 1:500	Abcam
Anti Laminin Kc cell, (LanKc) (Gutzeit et al., 1991)	Kaninchen, 1:2000	Stefan Baumgartner (Lund University)
Anti Laminin WB <sup>Nh2-25610</sup> , (LanWB), (Martin et al., 1999)	Kaninchen, 1:100	Stefan Baumgartner (Lund University)
Anti Nidogen; (Ndg), (Wolfstetter et al., 2009)	Kaninchen, 1:500 (IH), 1:2500 (WB)	Stefan Baumgartner (Lund University)
Anti Perlecan (Friedrich et al., 2000)	Kaninchen, 1:1000	Stefan Baumgartner (Lund University)
Anti Red Fluorescent Protein (5F8), (RFP)	Ratte, 1:1000	Chromotek
Anti Sparc, (SPARC), (Martinek et al., 2008)	Kaninchen, 1:500	Maurice Ringuette (University of Toronto)
Anti $\alpha$ -Tubulin (B512), ( $\alpha$ -Tub)	Maus, 1:10000 (WB)	Sigma Aldrich
Anti $\beta$ 3-Tubulin; ( $\beta$ 3Tub), (Leiss et al., 1988)	Meerschweinchen, 1:12000	Renate Renkawitz-Pohl (Philipps-Universität Marburg)

### 3.8.2. Sekundärantikörper

**Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper**

Name/Antigen	Spezies, Verdünnung	Herkunft/Bezugsquelle
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 Kaninchen IgG, Cy2- konjugiert, DyLight 488	Ziege, 1:2000	Vector Laboratories
Anti Maus-IgG, Cy3-konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova
Anti Kaninchen IgG, Cy3- konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova
Anti Ratte IgG, Cy3-konjugiert, DyLight 488	Ziege, 1:500	Vector Laboratories

Anti Meerschweinchen-IgG Cy3-Konjugiert	Ziege, 1:100	Dianova
--	--------------	---------

### 3.8.3. Seren

**Tabelle 6: Verwendete Seren**

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

### 3.9. Fluoreszenzfarbstoffe

**Tabelle 7: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe**

Name (Abk., Referenz)	Verdünnung	Bezugsquelle
Hoechst 33342 (Hoechst)	1:2000 (Stock: 5 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Acridin Orange	(Stock: 100 mM)	Carl Roth GmbH
Phalloidin- Tetramethylrhodamin B isothiocyanate	1:2000 (Stock: 0,05 mg/ml)	Sigma
Phalloidin-iFluor 4898 Reagent Cytointer	1:2000 (Stock: 0,05 mg/ml)	Abcam
Phalloidin-Coumarin labeled	1:500 (Stock: 0,05 mg/ml)	Sigma

### 3.10. Einbettungsmedien und Immersionsöl

**Tabelle 8: Verwendete Einbettungsmedien und Immersionsöl**

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

### 3.11. Enzyme und Puffer

**Tabelle 9: Verwendete Enzyme und Puffer**

Name	Bezugsquelle
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
MyTaq DNA Polymerase	Bioline
ThermoPol Reaktionspuffer (10x)	New England Biolabs
MyTaq Reaktionspuffer (5x)	Bioline
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Antarctic Phosphatase Enzympuffer	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
NEBuffer 3.1	New England Biolabs
T7 RNA Polymerase	Roche Applied Science
SP6 RNA Polymerase	Roche Applied Science

### 3.12. Primerliste

Die verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) abgeleitet um eine möglichst hohe Effizienz der Amplifikation zu erreichen.

Tabelle 10: Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung von *Drosophila*-DNA

Oligoname	Sequenz (5'→3')
LanB1 IE 5' Forward	CGAGTACGGATTCCCCACTGAAG
LanB1 IE 5' Reverse	CCGGCACTAGAAATGTTCTGAAAC
LanB1 IE 3' Forward	CAGTGGTCAGTCGCGAGGAA
LanB1 IE 3' Reverse	CGATAAGCCGCAGCTCCAAC

Tabelle 11: Verwendete Primer zur CHIP-qPCR

Oligoname	Sequenz (5'→3')
LanB1-GATA-TFBS1 Forward	ACTCCTTCTCCCTGCCTATTCT
LanB1-GATA-TFBS1 Reverse	CGGATGCGAAGGAGTGGAAA
LanB1-GATA-TFBS2 Forward	TTGTGGCACACTGCCTCTTT
LanB1-GATA-TFBS2 Reverse	GGCATTGGAAGCCCTTGCC
LanB1-Srp-TFBS1+2 Forward	AAAACCTGGGTTCTTATCTCACCG
LanB1-Srp-TFBS1+2 Reverse	ACTGATAAAAACAGCGATCCAACG
LanB1-GATA-TFBS3+4 Forward	ACTGATAAAAACAGCGATCCAACG
LanB1-GATA-TFBS3+4 Reverse	CCGACTACTCTCAATATAAGGTCCC
LanB1-Srp-TFBS3 Forward	TGGTACGAGACGAAAATAAATCGG
LanB1-Srp-TFBS3 Reverse	AATCAAGCAAGTGGGAGCGA
LanB1-control1 Forward	AATCAAGCAAGTGGGAGCGA
LanB1-control1 Reverse	CCAGACTGACCGAGGTGTTT
LanB1-control2 Forward	ATGGCCCAACCCACTTTTCA
LanB1-control2 Reverse	TGCTAATCGCGCACAAACAA
LanB2-Srp-TFBS1 Forward	ATGAAACCGAAAGTGCGGC
LanB2-Srp-TFBS1 Reverse	AGCTGGACTCTCTGCTCTACT
LanB2-GATA-TFBS1 Forward	TCGACTTGTTGTTGCTGCCT
LanB2-GATA-TFBS1 Reverse	CGGGAAACACTCCGTCACAT
LanB2-TFBS-GATA-TFBS2-Srp-TFBS2 Forward	TTTCGAACCGTAAAGAGCCCA
LanB2-TFBS-GATA-TFBS2-Srp-TFBS2 Reverse	AAGTCCTATGTTTATCAATGGCACC
LanB2-control1 Forward	TCATTGTGGCGGTTTCCTGT
LanB2-control1 Reverse	GCCTGATCCTTCTTGCTGGT
LanB2-control2 Forward	ATGAATTTGGAAGCGTGGCG
LanB2-control2 Reverse	CGCCTGTAGCCCGGATAAAA

Tabelle 12: Verwendete plasmidspezifische Primer zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung

Oligoname	Sequenz (5'→3')
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAGC
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
pGreen H-Pelican MCS Forward	CCGATCAATTGTGCTCGGCAAC
pGreen H-Pelican MCS Reverse	CTTGCTCACCATGGTGGCGA

### 3.13. Vektoren

**Tabelle 13: Verwendete Vektoren**

Name (Referenz)	Bezugsquelle
pGEM-T Easy Vektor (Abb. A1)	Promega
pGreen H Pelican-Transformationsvektor (Abb. A2) (Barolo et al., 2000)	Achim Paululat (Universität Osnabrück)

### 3.14. Bakterienstämme

**Tabelle 14: Verwendete Bakterienstämme**

Name	Bezugsquelle
BioBlue 10 <sup>9</sup>	Bioline
BioBlue 10 <sup>8</sup>	Bioline

### 3.15. Fliegenstämme

Die Fliegenstämme, welche mit dem Präfix Bl gekennzeichnet sind, wurden aus dem Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://www.flystocks.bio.indiana.edu>) bezogen. Die Fliegenstämme, welche mit dem Präfix Ky gekennzeichnet sind, wurden aus dem *Drosophila* Genetic Resource Center, Kyoto (<http://www.dgrc.kit.ac.jp>) bezogen. Die Fliegenstämme, welche mit dem Präfix Vi gekennzeichnet sind, wurden aus dem Vienna *Drosophila* RNAi Center (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>) bezogen.

Die Beschreibung der Genotypen folgt der Nomenklatur nach (Lindsley and Zimm, 1992) und gemäß den Richtlinien der „Genetic nomenclature for *Drosophila melanogaster*“ des Flybase-Konsortiums (<http://flybase.org>; McQuilton et al., 2012; Thurmond et al., 2019).

**Tabelle 15: Reporterlinien**

Fliegenlinie, Abk. (Ref.)	Stammnummer	Genotyp
LanB1 IE 5'-GFP (diese Arbeit)	-	<i>w LanB1 IE 5'-GFP</i>
	-	<i>w; LanB1 IE 5'-GFP</i>
	-	<i>w; ; LanB1 IE 5'-GFP</i>
LanB1 IE 3'-GFP (diese Arbeit),	-	<i>w; LanB1 IE 3'-GFP</i>
	-	<i>w; ; LanB1 IE 3'-GFP</i>
LanB2 UE-GFP (Bischoff, 2016)	-	<i>w; LanB2 UE-GFP</i>
LanB2 IE 5'-GFP (Bischoff, 2016)	-	<i>w; LanB2 IE 5'-GFP</i>
LanB2 IE 3'-GFP (Bischoff, 2016)	-	<i>w; LanB2 IE 3'-GFP</i>
	-	<i>w; ; LanB2 IE 3'-GFP</i>
Mmp1 <sup>lacZ</sup> (Spradling et al., 1999)	Bl-12205	<i>y<sup>1</sup> w<sup>67c23</sup>; P{lacW}Mmp1<sup>k04809</sup>/CyO</i>
Mmp2 <sup>lacZ</sup> (Spradling et al., 1999)	Bl-10359	<i>y<sup>1</sup> w<sup>67c23</sup>; P{lacW}Mmp2<sup>k00604</sup>/CyO</i>
Mmp2::eGFP (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015)	Bl-60512	<i>y<sup>1</sup> w<sup>67c23</sup>; Mi{PT-GFSTF.2}Mmp2<sup>M100489-GFSTF.2/SM6a</sup></i>
trol::GFP (Morin et al., 2001)	Ky-110807	<i>w* P{w+mC=PTT-un1}ZCL1700</i>
vkq::GFP (Morin et al., 2001)	Ky-110626	<i>w*; P{w+mC=PTT-un1}G00205</i>

LanB1::GFP <sup>fTRG</sup> (Sarov et al., 2015)	Vi-318180	<i>w</i> ; ; <i>LanB1::GFP<sup>fTRG</sup></i>
Mmp1::GFP <sup>fTRG</sup> (Sarov et al., 2015)	Vi-318052	<i>w</i> ; ; <i>Mmp1::GFP<sup>fTRG</sup></i>

**Tabelle 16: Mutanten**

Fliegenlinie, Abk. (Ref.)	Stammnummer	Genotyp
Ndg <sup>Δ0.4</sup> (Wolfstetter et al., 2019)	-	<i>w</i> *; <i>Ndg<sup>Δ0.4</sup></i>
Ndg <sup>Δ1.4</sup> (Wolfstetter et al., 2019)	-	<i>w</i> *; <i>Ndg<sup>Δ1.4</sup></i>
Mmp1 <sup>2</sup> (Page-McCaw et al., 2003)	Bl-58709	<i>w</i> *; <i>Mmp1<sup>2</sup>/CyO</i>
Mmp1 <sup>Q11stop</sup> (Page-McCaw et al., 2003)	Bl-59380	<i>w</i> *; <i>Mmp1<sup>Q112stop</sup>/CyO-Df(2R)B80, y+</i>
Mmp1 <sup>Mi03787</sup> (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015)	Bl-37224	<i>y<sup>1</sup> w</i> *; <i>Mi{MIC}Mmp1<sup>Mi03787</sup></i>
Mmp2 <sup>Mi02914</sup> (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015)	Bl-36162	<i>y<sup>1</sup> w</i> *; <i>Mi{MIC}Mmp2<sup>Mi02914</sup>/SM6a</i>
srp <sup>neo45</sup> (Cooley et al., 1988; Rehorn et al., 1996)	Bl- 59020	<i>w</i> *; ; <i>P{hsneo}srpneo45 e1/TM6B, Tb1</i>
srp <sup>3</sup> (Nelson and Szauter, 1992; Reuter, 1994)	Bl-2485	<i>ru<sup>1</sup> h<sup>1</sup> Diap1<sup>1</sup> st<sup>1</sup> cu<sup>1</sup> srp<sup>3</sup> sr<sup>1</sup> es ca<sup>1</sup>/TM3, Sb<sup>1</sup> Ser<sup>1</sup></i>
<i>w<sup>1118</sup></i>	Bl-3605	<i>w<sup>1118</sup></i>

**Tabelle 17: GAL4-Linien**

Fliegenlinie, Abk. (Ref.)	Stammnummer	Genotyp
Act5C-GAL4	Bl-4414	<i>y<sup>1</sup> w</i> *; <i>P{Act5C-GAL4}25FO1 / CyO, y<sup>+</sup></i>
Mef2-GAL4	Bl-27390	<i>y<sup>1</sup> w</i> *; <i>P{GAL4-Mef2.R}3</i>
Mhc-GAL4	Bl-55133	<i>w</i> *; ; <i>P{Mhc-GAL4.K}2/TM3, Sb1</i>
48Y-GAL4	Bl-4935	<i>w</i> *; <i>P{GawB}48Y</i>

**Tabelle 18: UAS-Linien**

Fliegenlinie, Abk. (Ref.)	Stammnummer	Genotyp
UAS-srpNC (Waltzer et al., 2002)	-	
UAS-lacZ	Bl-1776	<i>w<sup>1118</sup></i> ; <i>P{UAS-lacZ.B}melt<sup>Bg4-1-2</sup></i>
UAS-lacZ	Bl-1777	<i>w</i> *; ; <i>P{UAS-lacZ.B}Bg4-2-4b</i>
UAS-mCD8::RFP	Bl-32218	<i>w</i> *; <i>P{10XUAS-IVS-mCD8::RFP}attP2</i>
UAS-mCherry	Bl-38425	<i>w</i> *; <i>P{UAS-mCherry.NLS}2; MKRS/TM6B, Tb1</i>
UAS-Mmp2-RNAi (Ni et al., 2008)	Bl-31371	<i>y<sup>1</sup> v<sup>1</sup></i> ; <i>P{TRiP.JF01337}attP2</i>
UAS-srp-RNAi	Bl-34080	<i>y<sup>1</sup> sc</i> * <i>v<sup>1</sup></i> ; <i>P{TRiP.HMSO1083}attP2</i>

**Tabelle 19: Defizienz-Linien**

Fliegenlinie, Abk. (Ref.)	Stammnummer	Genotyp
Df Ndg	Bl-23666	$w^{1118}; Df(2R)BSC281/CyO$

**Tabelle 20: Balancer-Linien**

Fliegenlinie, Abk. (Ref.)	Stammnummer	Genotyp
If/CyO Dfd-YFP	-	$w^*; Krlf-1/CyO Dfd-YFP$
If/CyO hg-lacZ	-	$w^*; Krlf-1/CyO hg-lacZ$
Dr/Sb TdZ	-	$w^*; ; Dr/TM3, Sb, Df-lacZ$
Dr/TM3 Dfd-YFP	Bl-23231	$w^*; ; ry^{506} Dr^1/TM3, P\{Dfd-GMR-nvYFP\}3, Sb^1$

### 3.16. Verwendete Software

**Tabelle 21: Verwendete Software**

Name (Referenz)	Version	Bezugsquelle
Adobe Photoshop CS	v8.0.1	Adobe Systems
Adobe Reader/Writer	v10.1.7	Adobe Systems
AnalySIS	v2.3	Olympus
Bioedit	v7.0.5	Tom Hall
CellSens Standard	v2.3	Olymous
CFX Manager	v2.1	BioRad
Chromas	v2.33	Technelysium Pty Ltd
IGV (Integrative Genomics Viewer) (Thorvaldsdottir et al., 2013)	v2.4.10	Broad Institute and the Regents of the University of California
ImageJ	v1.5.1	
Leica Confocal Software		Leica Microsystems
Mendeley	v2.5.1	Elsevier
Microsoft Office 2003		Microsoft
Microsoft Office 2016		Microsoft
R	v3.5.1	The R Foundation

## 4. Methoden

### 4.1. Präparation genomischer DNA

#### Squishing Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteinase K

Für die Präparation genomischer DNA wurden 20 Fliegen mit dem gewünschten Genotyp abgesammelt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C für 30 Minuten eingefroren. Pro Fliege wurden 50 µl Squishing Puffer zugegeben, die Fliegen wurden mit einem Pistill zerkleinert und zerdrückt bis eine möglichst homogene Lösung entstand. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K bei 85 °C für zehn Minuten inaktiviert. Die Lösung wurde zentrifugiert, der DNA-haltige Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Konzentration bestimmt (4.4). Die genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 4.2. Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

(Mullis and Faloona, 1987)

Für die gezielte Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes wurde zuvor präparierte DNA mit dem unten beschriebenen Reaktionszyklus exponentiell vervielfältigt. Dazu werden Primer benötigt, die komplementär zu den Randbereichen des zu synthetisierenden DNA-Fragments sind und so liegen, dass ihre 3'-Enden jeweils in die Richtung des zu synthetisierenden Strangabschnittes zeigen. Innerhalb eines Reaktionszyklus wird die DNA aufgeschmolzen (Denaturierung), die Primer hybridisieren an die komplementären Bereiche der DNA (Annealing) und eine hitzestabile Polymerase amplifiziert den von den Primern gebundenen Strang komplementär in 3'-Richtung (Elongation).

Denaturierungsschritt: 5 min bei 95 °C

Anzahl der PCR Zyklen: 35

Zusammensetzung eines PCR Zyklus:

1. Denaturierung: 1 min bei 95 °C

2. Primerhybridisierung: 1 min

3. Elongation: (Zeit ist abhängig von der Fragmentgröße) bei 72 °C

Abschließende Elongation 10 min bei 72 °C

Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 25 µl oder 50 µl und enthielt die folgenden Bestandteile:

#### Template

Genomische DNA 1 ng–1 µg

Plasmid DNA 1 pg–1 ng

#### Primer

Forward-Primer 20 pM

Reverse-Primer 20 pM

#### Desoxynukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 10 nM

ThermoPol-Reaktionspuffer  $\frac{1}{10}$  VT

Taq-DNA-Polymerase 1-5 U

add. ddH<sub>2</sub>O

#### 4.2.1. Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Mithilfe der quantitativen PCR wurden Unterschiede in der DNA-Konzentration der eingesetzten Templates gemessen. Die Quantifizierung erfolgte dabei durch Messung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I. Dieser Farbstoff bindet an die doppelsträngige DNA bei deren Polymerisation. Damit steigt bei jedem Elongationsschritt das Fluoreszenzsignal, welches anschließend gemessen wird. Durch Vergleich der *Cycle Threshold* (CT)-Werte, welche den Beginn des exponentiellen Wachstums anzeigen, wurde auf die Konzentration der DNA rückgeschlossen.

Denaturierungsschritt: 5 min bei 95 °C

Anzahl der PCR Zyklen: 45

Zusammensetzung eines PCR Zyklus:

1. 5 Sekunden bei 95 °C

2. 20 Sekunden bei 60 °C

Abschließende Elongation 10 Sekunden bei 72 °C

Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 15 µl und enthielt die folgenden Bestandteile:

<b>Template</b>	1-100 ng
<b>Primer</b>	
Forward-Primer	10 pM
Reverse-Primer	10 pM
<b>SYBR Green Mastermix</b>	$\frac{1}{2}$ VT
<b>add. ddH<sub>2</sub>O</b>	

#### 4.3. Agarosegelelektrophorese

##### Ladepuffer (10x)

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

0.1 % (w/v) Xylenecyanol, 0.1 % (w/v) Tetrazin O, 40 % Glycerin (v/v), 60 mM EDTA

##### TAE Puffer (50x)

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

Zuerst wurde ein 1 %-Agarosegel aus 50 ml 1x TAE-Puffer und 0,5 g Agarose hergestellt. Die Lösung wurde mehrmals in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die flüssige Agarose wurde mit 0,7 µl Acridin-Orange gemischt und in eine Gelkammer gegossen. Das Einstecken eines Kammes sorgte für die Bildung von Taschen, in denen später die Proben aufgetragen wurden. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde die Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett mit Puffer bedeckt war. Anschließend konnte ein DNA-Größenstandard, welcher zur Bestimmung der Fragmentgrößen benötigt wurde, sowie die Proben aufgetragen werden. Als Größenstandard wurde ein zur Größe der Ziel-DNA passendes Markersystem verwendet. Die Proben wurden noch mit einem  $\frac{1}{10}$  VT Ladepuffer durchmischt. Dieser beschwert die DNA und sorgt dafür, dass die Proben in die Taschen sinken. Nachdem die Kammer geschlossen wurde, konnte das Netzgerät angeschaltet werden. Die Auftrennung erfolgte bei 115 V. Die DNA-Fragmente wanderten im elektrischen Feld zur Anode und wurden der Größe nach aufgetrennt. Um eine sichtbare Auftrennung der Banden zu gewährleisten, sollte der Fortschritt der Elektrophorese durch den negativ geladenen Farbstoff aus dem Ladepuffer verfolgt werden, da dieser proportional zu den DNA-Fragmenten wandert. Schließlich wurde das Ergebnis unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### 4.3.1. Denaturierende RNA Agarosegelelektrophorese (Masek et al., 2005)

Um die in einer *in vitro* Transkription (4.9) hergestellten RNA Sonde zu analysieren, wurde eine denaturierende RNA Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde wie unter 4.3 ein Agarosegel vorbereitet und dieselbe Durchführung bis auf folgende Unterschiede abgehandelt. Zu 1 µl RNA Probe wurden 8 µl deionisiertes Formamid gegeben. Der Ansatz wurde bei 65 °C für fünf Minuten inkubiert und anschließend direkt auf Eis überführt. Die Probe wurde mit einem µl Ladebuffer vermischt, aufgetragen und nach Abschluss analysiert und dokumentiert.

#### 4.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

##### 4.4.1. OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung des DNA-Gehalts von Proben wurde die Absorption in wässriger Lösung gemessen. Unter Berücksichtigung der optischen Dichte von Nukleinsäuren (die Absorption einer wässrigen Nukleinsäurelösung liegt bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm), dem Verdünnungsfaktor und einem Multiplikationsfaktor, der spezifisch für die jeweilige Art der Nukleinsäure ist (ssDNA=33 µg/ml, dsDNA=50 µg/ml, Oligonukleotide=20 µg/ml und RNA=40 µg/ml) konnte die DNA Konzentration einer Lösung mit der unten aufgeführten Formel bestimmt werden.

Nukleinsäurekonzentration [µg/ml] = OD<sub>260</sub> x Verdünnungsfaktor x Umrechnungsfaktor

##### 4.4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA mittels Agarosegelelektrophorese

Um die Konzentration von DNA/RNA von einer spezifischen Fragmentlänge zu bestimmen, wurde die Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.3) aufgetrennt und die Konzentration der Probe durch den Vergleich der Bandenintensität mit der Intensität eines definierten Größenstandards (3.5) verglichen.

#### 4.5. Enzymatischer Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Um DNA an gewünschten Stellen zu prozessieren, werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese bakteriellen Enzyme schneiden DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und können in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden, in denen zwischen Enzymen unterschieden wird, die 5'-überhängende Schnittkanten, 3'-überhängende Schnittkanten oder glatte bzw. *blunt end* Schnittkanten produzieren.

Ein Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 20 oder 50 µl und enthielt die folgenden Bestandteile:

<b>Restriktionsenzym</b>	1 U
<b>Reaktionspuffer</b>	$\frac{1}{10}$ VT
<b>DNA</b>	1-10 µg
<b>add. ddH<sub>2</sub>O</b>	

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme haben ein Temperaturoptimum von 37 °C und werden bei 65 °C für 20 Minuten deaktiviert. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde und höchstens über Nacht in einem Wärmeschrank oder einem Thermocycler. Der jeweilige genutzte Reaktionspuffer wurde nach höchst möglicher Effizienz der eingesetzten Enzyme ausgewählt (nach Herstellerangaben).

## 4.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

### 4.6.1. Ligation

Um ein spezifisches DNA-Fragment in einen Vektor einzubringen, wurde über T4 DNA-Ligase die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei sich gegenüberliegenden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden in doppelsträngiger DNA katalysiert. Hierzu müssen die DNA Fragmente kompatible Enden besitzen. Es wurde zum einen das pGEM-T Vektorsystem genutzt und zum anderen die jeweilige zu prozessierende DNA mittels enzymatischen Verdau entsprechend vorbereitet.

#### 4.6.1.1. Ligation mittels TA-Ligation

(Holton and Graham, 1991; Ichihara and Kurosawa, 1993)

Der p-GEM-T-easy Vektor liegt in linearisierter Form mit je einem einzelnen 3' terminalen Thymidin an beiden Enden vor. Somit können DNA Fragmente, die aus einer PCR gewonnen wurden, direkt zur Ligation verwendet werden, da die Taq-Polymerase nach der Amplifikation ein 3' Adenin Überhang hinterlässt. Zudem wird die Rezirkulation des Vektors ohne Insert verhindert.

Nach der Amplifikation des gewünschten DNA Fragmentes (4.2) wurde der Ansatz über Gel-Elektrophorese aufgetrennt (3.2), damit wurde die korrekte Bandengröße überprüft und diese unter möglichst kurzer UV-Bestrahlung ausgeschnitten. Die präparierte DNA wurde mittels Gel-Extraktions-Kit aufgereinigt (4.8.1) und abschließend die Konzentration der Lösung ermittelt (4.4). Die Aufreinigung über eine Silikamembransäule verringert hierbei die Wahrscheinlichkeit unvollständig amplifizierte DNA Fragmente oder Primer zu amplifizieren.

### 4.6.2. Transformation

#### **IPTG**

0,1 M IPTG in ddH<sub>2</sub>O

#### **X-Gal**

2 % (w/v) X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) in Dimethyl-formamid

Steriler LB-Agar (3.7) wurde erhitzt, bis er komplett flüssig und homogen war, anschließend auf Raumtemperatur gestellt, bis er unter 55 °C (handwarm) abgekühlt war und mit 50 µg/ml Ampicilin versetzt wurde. Auf die abgekühlten Platten wurde 40 µl IPTG und 40 µl X-Gal auf der Oberfläche verteilt. Die Platten wurden zur weiteren Verwendung auf 37 °C vorgewärmt.

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien mit hoher Kompetenz (10<sup>8</sup> oder 10<sup>9</sup> cfu/µg DNA; 3.14) verwendet. Die Bakterien wurden von der Lagerung auf -80 °C direkt auf Eis überführt und darauf aufgetaut. Der Ligationsansatz (4.6.1) wurde kurz zentrifugiert, um den kompletten Ansatz am Boden des Gefäßes zu sammeln. Aus dem Ligationsansatz wurden 2 µl in die auf Eis befindlichen kompetenten Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig angetippt, um die Lösung zu durchmischen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden bei exakt 42 °C transformiert und danach wieder auf Eis überführt und für zwei Minuten inkubiert. Bei der Überführung der Zellen in und aus dem Wasserbad wurde darauf geachtet, die Proben möglichst vorsichtig und dennoch zügig zu bewegen, ohne sie dabei zu schütteln. Zu den Zellen wurde 950 ml SOC Medium gegeben und die Ansätze bei 37 °C für 1,5 Stunden mit 200 UpM geschüttelt. Danach wurden 50 bis 200 µl der vermehrten Zellen auf die zuvor vorgewärmten LB-

Platten verteilt, bei Raumtemperatur einziehen gelassen und dann über Nacht bei 37 °C mit der Agarschicht nach oben inkubiert.

#### 4.6.3. Klon-Check-PCR

Um die Transformationsergebnisse der über Nacht gewachsenen Bakterienklone zu testen, wurden die LB-Agar Platten zunächst für mehrere Stunden bei 4 °C inkubiert, um Klone, die potentiell kein Insert tragen und damit ein intaktes *lacZ* besitzen, durch ihre dann deutlich werdende Blaufärbung besser detektieren zu können. Als Negativkontrolle wurde immer ein Blau gefärbter Bakterienklon mitgetestet. Für jeden getesteten Klon wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß 5 µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt. Die getesteten Klone wurden mit einem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze abgestrichen und in das im PCR-Reaktionsgefäß befindliche Wasser verteilt. Daran anschließend wurde jeder entsprechende Klon an eine neue LB-Agarplatte aufgebracht. Die neu angesetzten Klone wurden entsprechend dem PCR-Ansatz markiert und die LB-Agar Platte wieder über Nacht bei 37 °C inkubiert, um positive Klone weiter vermehren zu können. Die in Wasser verteilten Klone wurden als 5 µl Template genutzt und mit den Komponenten für eine PCR versetzt (4.2). Die initiale Denaturierung wurde auf zehn Minuten verlängert und ansonsten die zuvor aufgeführte Reaktion für eine PCR (4.2) genutzt. Anschließend wurden die Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese (4.3) analysiert.

#### 4.6.4. Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA mit der Antarktischen Phosphatase

Für eine Retransformation wurde das zu transformierende Insert aus dem Ausgangsvektor durch enzymatischen Verdau (4.5.1) geschnitten. Zudem wurde der Zielvektor mit denselben Enzymen prozessiert, um für eine erfolgreiche Ligation passende Schnittstellen zu schaffen. Um die direkte Religation eines Vektors zu verhindern, wurden die 5' Phosphatgruppen des Zielvektors mit der Antarktischen Phosphatase katalysiert. Bei Kompatibilität bezüglich des Puffers wurde der enzymatische Verdau und die Dephosphorylierung parallel in einer Reaktion behandelt. Ansonsten musste der Vektor aufgereinigt werden (4.8) und wurde in folgendem Reaktionsansatz behandelt.

Der Reaktionsansatz umfasste 20 µl und beinhaltete die folgenden Bestandteile mit jeweiliger Konzentration:

<b>Antarktische Phosphatase</b>	5 units
<b>Reaktionspuffer</b>	$\frac{1}{10}$ VT
<b>DNA</b>	1 pmol DNA-Enden (1 pmol DNA-Enden $\approx$ 1 µg eines 3 kb Vektors)
<b>add. ddH<sub>2</sub>O</b>	

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für zwei Minuten inaktiviert. Vor der Ligation musste der Ansatz erneut aufgereinigt werden (4.8).

### 4.7. DNA-Präparation

#### 4.7.1. Minipräparation

(Birnboim and Doly, 1979)

Die DNA-Präparation im analytischen Maßstab wurde mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Hierzu wurden zunächst als positiv getestete Klone (4.6.3) in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 UpM schüttelnd vermehrt. Im Zuge der Zellyse wurde das bakterielle Chromosom zerbrochen und geschert, während die Plasmid-DNA intakt erhalten blieb. Die aus der Zellyse extrahierte DNA wurde

anschließend einer Denaturierung und einem alkalischen pH-Wert ausgesetzt. In der folgenden Neutralisierung renaturiert die zirkuläre Plasmid-DNA, während die gebrochene bakterielle DNA im denaturierten Zustand verblieb. Durch Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA von bakterieller DNA und Proteinen getrennt und konnte aufgereinigt werden.

4.7.1.1. Minipräparation mittels alkalischer Lyse  
(Sambrook and Russell, 2006)

#### **Lösung I**

50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA

#### **Lösung II**

0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS (die Lösung wurde immer frisch angesetzt)

#### **Lösung III**

3 M Kaliumacetat pH 5,2

1,5 ml einer über Nacht vermehrten 5 ml Bakterienkultur wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß für 30 Sekunden mit 13000 *g* Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Vorgang wurde mit weiteren 1,5 ml der entsprechenden Bakterienkultur wiederholt. Das gewonnene Pellet wurde mit 150 µl der Lösung I durch vortexen resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung II zugegeben, die Lösungen wurden gut durchmischt und für die Zellyse 30 Sekunden inkubiert. Die erfolgreiche Lyse konnte durch die visköse, schleimige Konsistenz nachvollzogen werden. Für die nachfolgende Neutralisation wurden 150 µl Lösung III hinzugegeben und der Ansatz wurde gründlich durchmischt. Die Proben wurden bei 13000 *g* Geschwindigkeit zentrifugiert und der gewonnene, klare Überstand, der die Plasmid-DNA beinhaltet, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA-haltige Lösung wurde mittels Isopropanolfällung (4.8.2.1) gereinigt und konzentriert.

4.7.1.2. Minipräparation mittels alkalischer Lyse mit Reagenziensatz  
Materialien: 5 Prime, Fast Plasmid Mini Kit

Die Minipräparation wurde nach Angaben des Herstellers vollzogen.

4.7.1.3. Mirapräparation  
(Pronobis et al., 2016)

Materialien: 5 Prime, Fast Plasmid Mini Kit; Thermo Scientific, Midi Gene JET Plasmid Midiprep Kit

Mit dem Protokoll der *Miracle* Präparation wurden Plasmide aus Bakterienkulturen aufgereinigt, wenn hohe Konzentrationen in einem Volumen einer Minipräparation benötigt wurden und die verfügbare Zentrifuge mit dem dazu einsetzbaren Rotor für die einer Midipräparation benötigten 15 ml Falcons nicht die ausreichende Geschwindigkeit erreichen konnte.

Der Inhalt einer 50 ml über Nacht Bakterienkultur wurde bei 4000 *g* und für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet mit 2 ml des im Midikit enthaltenen Resuspensionspuffer, welcher mit 50 µg/ml RNase A versetzt wurde, durch vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 2 ml Lysepuffer aus dem Midikit hinzugegeben und die Lösung mehrfach invertiert, anschließend für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2 ml des Neutralisationspuffers aus dem Midikit hinzugegeben und die Proben mehrfach invertiert. Zu

dieser Lösung wurden dann 0,5 ml Endotoxin Bindereagenz aus dem Midikit hinzugegeben und zügig, aber vorsichtig, mehrfach invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 13000 *g* Geschwindigkeit für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der gereinigte Überstand wurde in ein 15 ml Falcon überführt und mit einem Volumenteil 96 %-igem Ethanol versetzt und heftig geschüttelt. Von den Proben wurden jeweils 700 µl auf drei Silikamembran-Säulchen aus dem Minikit pipettiert und für 30 Sekunden bei 13000 *g* zentrifugiert. Die zentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Der Vorgang wurde solange wiederholt (es wurden immer dieselben drei Säulchen genutzt), bis die Probe vollständig über die Membran zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die Membranen mit 700 µl Waschpuffer aus dem Minikit durch Zentrifugation mit 13200 *g* und einer Minute gereinigt. Die zentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Die Silikamembranen wurden abschließend in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, mit 15 µl ddH<sub>2</sub>O bedeckt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und mit 13200 *g* für eine Minute eluiert. Die drei Elutionen einer Ausgangsprobe wurden vereinigt. Der Eluationsvorgang wurde zur besseren Ausbeute bezüglich der Gesamtmenge an gereinigter DNA wiederholt. Hierbei wurde zunächst in ein neues Eppendorfgefäß eluiert und anschließend die drei Eluate einer Ausgangsprobe wieder vereinigt.

#### 4.7.2. Midipräparation

Materialien: Genomed, Jetstar Plasmid Kit 2.0; Thermo Scientific, Midi Gene JET Plasmid Midiprep Kit

Die Midipräparation wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. In Bezug auf das Midi Gene JET Plasmid Midiprep Kit wurde die Variante: „*Protocol A. Plasmid DNA purification using low speed centrifuges*“ genutzt.

### 4.8. Reinigung von DNA

#### 4.8.1. Reinigung von DNA durch Silikamembranen

Materialien: GE Healthcare, illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit; Bionline, ISOLATE II PCR and Gel Kit

Die Reinigung von DNA mittels Silikamembranen erfolgte nach Angaben der Hersteller.

#### 4.8.2. Alkoholfällung

##### 4.8.2.1. Isopropanolfällung

Die wässrige DNA-haltige Lösung wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt, gut durchmischt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 Minuten gefällt. Der Ansatz wurde anschließend bei höchster Geschwindigkeit und bei Raumtemperatur für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zwei Mal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit offenem Deckel getrocknet, bis keine Alkoholreste mehr zu sehen waren und das Pellet anfangs glasig zu werden. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit einer entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O gelöst.

##### 4.8.2.2. Natriumacetat-Ethanol-fällung

Die wässrige DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Volumenteil 3 M Natriumacetat versetzt und anschließend wurden 2,5 Volumenteilen 100 %-iges Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wurde anschließend bei höchster Geschwindigkeit und bei Raumtemperatur für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen, das Pellet zwei Mal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit offenem Deckel getrocknet. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit einer entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 4.8.2.3. Phenol-Chloroform-Extraktion (Kirby, 1956)

Die wässrige DNA-haltige Lösung wurde mit einem Volumenteil Phenol versetzt, gevortext und bei höchster Geschwindigkeit für 30 Minuten zentrifugiert. Die obere, wässrige, DNA-haltige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, ohne dabei Partikel aus der Phasengrenze zu übernehmen. Die Lösung wurde mit einem Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25 : 24 : 1) versetzt, wieder wie zuvor gevortext, zentrifugiert und in ein neues Gefäß überführt. Derselbe Vorgang wurde dann mit Chloroform vollzogen. Um die Phenolreste zu entfernen, wurde abschließend eine Alkoholfällung (4.8.2.1 und 4.8.2.2) durchgeführt.

### 4.9. *in vitro* Transkription

Materialien: T7 oder SP6 RNA-Polymerase (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada), 10x Transkriptionspuffer (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada), DIG RNA-labeling Mix (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada), Biotin RNA-labeling mix (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada)

Für die *in vitro* Transkription von antisense RNA wird Template DNA benötigt, die in ein Plasmid mit flankierenden Bakteriophagen Promoter-Sequenzen (T7 oder SP6) kloniert wurde. Die Plasmid-DNA kann durch Enzym-Verdau linearisiert (4.5) werden oder als Template für eine PCR dienen (4.2). Das PCR-Produkt sollte möglichst frisch sein. Die Template DNA wird unter RNase freien Bedingungen aufgereinigt (4.8).

Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 50 µl und enthielt die folgenden Bestandteile:

#### Template

linearisierte DNA	0,5 – 1 µg
<b>DIG RNA-labeling mix</b>	2 µl
<b>Transkriptionspuffer</b>	$\frac{1}{10}$ VT
<b>RNA Polymerase</b>	2 µl
<b>RNase Inhibitor</b>	1 µl
<b>add. RNase freies H<sub>2</sub>O</b>	50 µl

Die Ansätze wurden bei 37 °C für 2-4 Stunden inkubiert.

Nach der Synthese wurde das Volumen mit RNase freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit 0,1 VT Natriumacetat (3M) und 2,5 VT eiskaltem Ethanol (100 %) üN bei -20 °C präzipitiert. Die mRNA wurde 15 Minuten bei 4 °C mit höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und vorsichtig mit eiskaltem Ethanol (70 %, in DEPC-Wasser) gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Eine entsprechende Menge wurde per denaturierenden Gelelektrophorese quantifiziert und analysiert (4.3.1). Die Proben wurden mit Hybridisierungspuffer auf 50 ng/ml verdünnt und bei -70 °C gelagert.

#### 4.10. mRNA-Sonden Dot Blot

##### **DIG 1**

0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl

##### **DIG 2**

0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5 % Blockingreagenz

##### **DIG 3**

0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

##### **AP Puffer 9,5**

0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>

##### **NBT-Lösung**

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat in 100 % Dimethylformamid

##### **BCIP-Lösung**

75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumsals in 70 % Dimethylformamid

Um die Färbeintensität einer in der *in vitro* Transkription (4.9) hergestellten RNA Sonde und die erfolgreiche DIG-Markierung zu überprüfen, wurde ein mRNA Sonden Dot Blot durchgeführt. Die mRNA Sonde wurde in einer Verdünnungsreihe von 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und jeweils ein µl auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond N) aufgetragen. Der Tropfen wurde mit einem Bleistift markiert und die Membran für zwei Stunden bei 80 °C vernetzt. Die Membran wurde anschließend in eine Petrischale überführt, mit dem DIG1 Puffer für eine Minute gewaschen und dann mit DIG2 für 30 Minuten geblockt. Für die Detektion der DIG Markierung wurde die Membran 30 Minuten mit alkalischer Phosphatase gekoppelten α-DIG-Antikörper, der in DIG2 verdünnt wurde, inkubiert. Der Antikörper wurde anschließend zwei Mal für 15 Minuten mit DIG1 ausgewaschen, dann für zwei Minuten in DIG3 äquilibriert und anschließend wurde die Membran mit BCIP (3,5 µl/ml) und NBT (4,5 µl/ml) für genau fünf Minuten im Dunkeln gefärbt. Die Farbstoffe wurden zwei Mal mit DIG1 für je fünf Minuten ausgewaschen und die Membran abschließend getrocknet. Die Färbeintensität der jeweiligen Verdünnung wurde zur Orientierung für die Sondenverdünnung in der *in situ* Hybridisierung (4.21.10) genommen.

#### 4.11. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Microsynth SeqLab (Maschmühlenweg 36, 37081 Göttingen) durchgeführt.

#### 4.12. Synthese der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die PCR-Reaktionen und Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Anzinger Str. 7a, 85560 Ebersberg) synthetisiert.

### 4.13. Chromatin-Immunpräzipitation

(Ghavi-Helm et al., 2016; Moon et al., 2005; Sandmann et al., 2006)

#### 4.13.1. Quervernetzung der DNA-Protein Interaktion

##### **PBS (10x)**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

##### **F-PBS**

4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS

##### **PBS-Triton**

1x PBS, 0,5 % (v/v) Triton X-100

##### **Waschpuffer A**

10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25 % Triton X-100

##### **Waschpuffer B**

200 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25 % Triton X-100

##### **RIPA Puffer**

280 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,1 % Na-Deoxycholat

Materialien: Glass beads, säuregewaschen, 425-600  $\mu\text{m}$  (Sigma)

Zur Analyse von DNA-Protein Interaktion wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt. Zunächst wurden Embryonen durch Ablagen des gewünschten Genotyps gewonnen (4.21.6) und diese wie unter 4.21.11 abgesammelt und entchorionisiert. Die Embryonen wurden in einem Stahlkorbchen befindlich mit PBS-Triton gewaschen, auf ein Tuch gestellt, um die meiste Flüssigkeit zu entfernen, und gewogen. Hierbei wurde zügig gearbeitet, um ein Austrocknen der Embryonen zu verhindern. Es wurde 1 g Embryonen mit 2 ml F-PBS und 6 ml Heptan in einem 15 ml Falcon bei 200 UpM für 15 Minuten an der Phasengrenze fixiert. Durch auf Formaldehyd basierende Fixierung wurde die Bindung zwischen DNA und Protein *in vivo* quervernetzt. Die Embryonen wurden bei 4000 *g* herunterzentrifugiert, die Phasen wurden abgenommen, ohne dabei Embryonen mit aufzunehmen, und die Embryonen wurden mit 10 ml PBS-Triton und 125 mM Glycin gewaschen, um die Quervernetzung zu stoppen. Anschließend wurden die Embryonen auf einen Überkopfschüttler bei langsamer Geschwindigkeit für zehn Minuten mit 10 ml Waschpuffer A, danach mit 10 ml Waschpuffer B und abschließend in 10 ml RIPA Puffer gewaschen. Mit RIPA Puffer wurde die Zelllyse induziert. Die Proben wurden anschließend bis auf weitere Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 4.13.2. Sonifizierung

Um die quervernetzte DNA analysieren zu können, wurden das Chromatin sonifiziert und damit geschert. Zu den Embryonen wurden 0,5 ml mit Säure gewaschene Glasbeads gegeben und der RIPA Puffer bis auf ein Gesamtvolumen von 3 ml abgenommen. In einem Becherglas wurde 70 %-iges EtOH mit Eis verdünnt und auf etwa  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt. Das Becherglas wurde in einem mit Eis gefüllten Behälter kühl gehalten. Das Falcon wurde an die Halterung des Ultraschallgerätes befestigt. Die Mikrospitze des Ultraschallgerätes wurde in die Spitze des Flacons bis kurz vor berühren des Bodens adjustiert, ohne dass der Rand des Falcons berührt wurde. Das Chromatin wurde vier Mal für jeweils

30 Sekunden mit 20-40 % Energie sonifiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Puffer nicht zu stark schäumte und dementsprechend die Energiezufuhr angepasst. Zwischen jedem Sonifizierungsschritt wurde die Probe für eine Minute im Eisbad gekühlt. Das gescherte Chromatin wurde bei höchster Geschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert und in Aliquots mit je 1 ml bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### 4.13.3. Chromatin Immunpräzipitation

##### **RIPA Puffer**

280 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (v/v) SDS, 0,1 % (v/v) Na-Desoxycholsäure

##### **LiCl Puffer**

250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,5 % IPEGAL-CA630, 0,5 % (v/v) Na-Desoxycholsäure

##### **TE Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA

Materialien: Protein G Plus/Protein A Agarose Suspension, IP05 (Merck)

Die an den sonifizierten DNA Fragmenten gebundenen Proteine wurden anschließend mittels Chromatin Immunpräzipitation analysiert. Für die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße mit geringer Bindeaffinität für Proteine genutzt. Extrakt (1 ml) wurde mit 20 µl Protein A/G Beads versetzt und für eine Stunde bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Zeitgleich wurde der Antikörper mit 20 µl beads in 1 ml RIPA Puffer equilibriert, indem er ebenfalls auf einem Überkopfschüttler für eine Stunde bei 4 °C rotierte. Beide Lösungen wurden bei 4000 g für eine Minute herunterzentrifugiert, um die Beads in der Spitze des jeweiligen Gefäßes zu konzentrieren. Der Überstand im Ansatz mit dem Antikörper wurde verworfen. Der präabsorbierte Überstand des Ansatzes mit dem Chromatinextrakt wurde anschließend auf die mit dem Antikörper gekoppelten Beads gegeben. Die Probe wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die mit Antikörper gekoppelten Beads hatten durch diesen Schritt potentiell Proteine gebunden, die an DNA Fragmenten heften. Die Beads wurden mit 4000 g für eine Minute herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurde zunächst fünf Mal mit RIPA Puffer, einmal mit LiCl Puffer und schließlich zwei Mal mit TE Puffer gewaschen. Dabei wurde dazwischen wieder, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jeder Waschschrift wurde fünf Minuten und bei 4 °C mit einem Überkopfschüttler durchgeführt. Die Beads wurden abschließend in 100 µl TE Puffer aufgenommen.

#### 4.13.4. Auflösung der DNA Protein Interaktion

##### **RNaseA (10 mg/ml)**

##### **Proteinase K (20 mg/ml)**

Die Probe wurde mit 1 µl RNase A versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 7,5 µl 10 %-iges SDS und 3,8 µl Proteinase K zugegeben und anschließend zuerst für vier Stunden bei 37 °C und dann bei 65 °C über Nacht inkubiert. Die Probe wurde bei 4000 g herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Lösung wurde über eine Silikamembran aufgereinigt (4.8.1) und konnte als Template mit einer quantitativen PCR analysiert werden.

#### 4.14. Protein Präparation

(Laemmli, 1970)

##### **Laemmli Probenpuffer**

62,5 mM, 2 % SDS (v/v), 10 % Glycerol (v/v), 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v), 0,005 % Bromphenolblau (w/v)

Um Proteine analysieren zu können, wurden jeweils Embryonen, Larven, Puppen oder adulte Fliegen lebend in dreifach Laemmli Puffer gegeben und mit einem Pistill, welches zuvor mit RNase-away behandelt wurde, homogenisiert. Die Proben wurden bei 96 °C für 10 Minuten erhitzt und bei höchster Geschwindigkeit für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert und anschließend per SDS-Page (4.16) und Western Blot Analyse (4.17) weiterverwendet.

#### 4.15. Protein Dot Blot

##### **TBS**

20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5

##### **TBS-T**

20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5, 0.05 % (v/v) Tween20

##### **AP Puffer 9,5**

100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCl 0,5 % (v/v) Tween20 pH 9,5

Materialien: Nitrozellulose Membran

Eine entsprechende präparierte Proteinlösung wurde vor einer SDS-Page (4.16) und darauffolgender Western Blot Analyse (4.17) zunächst per Protein Dot Blot auf ausreichende Bindeaffinität und Spezifität eines Antikörpers getestet und dessen optimale Konzentration eingestellt.

Je 1  $\mu$ l aus Proteinlösungen von unterschiedlichen Stadien wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Um eine geeignete Antikörperkonzentration zu bestimmen, wurden Kopien einer Lösung von jeweils dem gleichen Stadium mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen getestet. Die entsprechende Stelle wurde mit Bleistift umrandet. Die Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in eine passende Petrischale überführt und anschließend mit TBS-T und 5 % BSA für eine Stunde geblockt. Der Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung in TBS-T mit 0,5 % BSA auf die Membran gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit TBS-T für fünf Minuten gewaschen. Darauf folgte die Behandlung mit Sekundärantikörper, die für 30 Minuten erfolgte, und anschließend drei Mal mit TBS-T und einmal mit TBS ausgewaschen wurde. Die Membran wurde anschließend mit AP Puffer 9,0, durch zehn minütige Inkubation umgepuffert. Die Färbung erfolgte mit BCIP und NBT, die in AP Puffer 9,0 verdünnt wurden. Die Färbereaktion wurde nach spätestens fünf Minuten durch mehrfaches waschen in H<sub>2</sub>O gestoppt. Die Membran wurde getrocknet und ausgewertet.

## 4.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

(Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989)

### Laemmli Probenpuffer

62,5 mM, 2 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau

### Sammelgelpuffer

1 M Tris pH 6,8, 4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 10 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) Ammoniumpersulfat, 1 % (v/v) TEMED

### Trenngelpuffer

1,5 M Tris pH 8,8, 7,5 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 10 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) Ammoniumpersulfat, 1 % (v/v) TEMED

### Elektrodenpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % (v/v) SDS

Proteine wurden mittels SDS-Page nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, um sie anschließend mittels Western Blot und Antikörperfärbung (4.17) detektieren zu können. Das Gießen und Auftrennen des SDS-Polyacrylamidgels erfolgte mit dem PerfectBlu Twin S System (Peglab) mit einem Format von 10 × 10 cm. Für die Analysen wurden ein 7,5 %-iges Trenngel und darauf ein 4 %-iges Sammelgel gegossen, worin mit dem Einsetzen eines Probenkamms Taschen für die spätere Probenzufuhr geschaffen wurden. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Methanol beschichtet, um eine gleichmäßige horizontale Abgrenzung zu schaffen. Die in dreifachen Probenpuffer gelösten und denaturierten Proteine wurden nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels zusammen mit einem für die Molekulargröße des zu analysierenden Proteins entsprechendem Größenstandard (3.5) in die Taschen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei 80 V, bis die Lauffront der Proteinproben die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hatte und wurde anschließend auf 200 V erhöht. Zur weiteren Analyse wurde das Trenngel vorsichtig aus der Kammer in eine entsprechende Schale überführt.

## 4.17. Western Blot

### Blotpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol

### TBS

Tris 20 mM, NaCl 137 mM pH 7,6

### TBS-T

Tris 20 mM, NaCl 137 mM, 0,1 % (v/v) Tween20 pH 7,6

### AP Puffer 9,5

100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCl 0.5 % (v/v) Tween20 pH 9,5

Materialien: PVDF Membran (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010), Blotpapier (Universal Saugpapier, BIOTEC-FISCHER, 361300)

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine (4.16) wurden durch einen Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen, welche anschließend durch Antikörperfärbung weiter analysiert wurde. Eine PVDF Membran und zehn Lagen Blotpapier wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde zur Aktivierung für eine Minute in Methanol gelegt und anschließend mehrfach mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach in Blotpuffer überführt. Das Gel wurde passgenau auf die PVDF Membran gelegt und unter die Membran, wie auch auf das Gel, fünf Lagen mit Blotpuffer befeuchtetes Blotpapier gelegt. Die Anordnung erfolgte dabei so, dass die PVDF Membran mit dem darunter liegenden Papier auf der Anode lag und darauf das Gel positioniert wurde, welches also näher zur Kathode gerichtet war. Die Übertragung der Proteine erfolgte mit einem Semi-Dry Blot Verfahren. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/1 cm<sup>2</sup> für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur und Schütteln mit 5 % Milchpulver in TBS-T geblockt. Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden bei 50 UpM durchgeführt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in TBS-T mit 0,5 % Milchpulver über Nacht bei 4 °C. Die Antikörperlösung wurde mit TBS-T drei Mal für jeweils zehn Minuten bei Raumtemperatur ausgewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in TBS-T. Der sekundäre Antikörper wurde mit TBS-T drei Mal für jeweils zehn Minuten bei Raumtemperatur ausgewaschen. Die Membran wurde für zwei Mal zehn Minuten mit AP Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbereaktion mit 3,5 µl BCIP und 4,5 µl NBT in kalten AP-Puffer gestartet. Die Reaktion fand auf Eis und im Dunkeln statt. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch mehrfaches Waschen mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran zur Auswertung getrocknet.

#### 4.18. Anfertigung von histologischen Schnitten mit Kryomikrotom

Die Analyse von Geweben mit histologischen Schnitten, die mit einem Kryomikrotom angefertigt wurden, ermöglichen einen detaillierten Einblick von Proteinlokalisierung durch immunhistochemischer Detektion, besonders bei Nutzung von Fluoreszenz-Techniken. Die Methode wurde genutzt, um in Puppen Proteine während der Metamorphose zu detektieren, ohne das Gewebe dabei durch Präparation zu beeinträchtigen.

##### 4.18.1. Präparation von Puppen

###### **PBS (10x)**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

###### **F-PBS-Triton**

4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS, 0,5 % (v/v) Triton X-100

Puppen wurden mit einem Pinsel aus den Röhren abgesehen und unter stereomikroskopischer Beobachtung dem entsprechenden Stadium zugeordnet. Puppen der Stadien eins bis vier (Bainbridge and Bownes, 1981) wurden mit einer feinen Augenschere am anterioren Ende transversal eingeschnitten, sodass lediglich das zurückgezogene Mundwerkzeug getroffen wurde. Bei Puppen ab dem Stadium fünf wurde vom anterioren Ende mit feinen Pinzetten die Puppenhülle vorsichtig um die Kopfregion herum entfernt. Die Puppen wurden mit F-PBS-Triton für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht schüttelnd fixiert. Die Puppenhülle, der Puppen ab dem Stadium fünf wurde anschließend vorsichtig mithilfe der Augenschere entfernt, ohne dabei das Gewebe zu verletzen. Hierzu wurde vom schon entfernten anterioren Ende angefangen und die Puppenhülle vorsichtig längs eingeschnitten. Die Kompartimente wurden danach mit Pinzetten entfernt. Die Puppen wurden

erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht in F-PBS-Triton schüttelnd fixiert. Im Anschluss wurden die Puppen für je 15 Minuten drei Mal mit PBS gewaschen.

#### 4.18.2. Infiltration

Materialien: OCT (Tissue-Tek), Cryomolds (Tissue-Tek)

Die fixierten Puppen wurden drei Mal für je 15 Minuten mit PTW gewaschen und im Anschluss mit einem aufsteigenden Gradienten in Sucrose (5 %, 10 %, 20 %, 30 %, in PTW) inkubiert. Die Inkubationszeit betrug pro Schritt mindestens vier Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur. Nach der Sucrose Infiltration wurden die Puppen in die Optimal cutting temperature-Lösung überführt und für mindestens vier Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 4.18.3. Einfrieren der Proben

Cryomolds wurden bis zur Hälfte mit OCT gefüllt und für fünf Minuten bei -20 °C gefroren. Die Cryomolds wurden wieder auf Raumtemperatur gestellt und die Puppen aus der Infiltrationslösung auf die feste OCT Schicht in den Cryomolds überführt. Unter stereomikroskopischer Beobachtung wurden die Puppen entsprechend der gewünschten anatomischen Hauptrichtung der nachfolgenden Schnitte orientiert. Das Cryomold mit der enthaltenen Puppe wurde mit OCT gefüllt. Die Probe wurde so lange auf Raumtemperatur stehen gelassen, bis die untere Schicht leicht viskös wurde. Die beiden OCT Schichten sollten dabei ineinander übergehen, um ein späteres Brechen der Probe beim Schneiden zu verhindern. Im Anschluss wurde die Probe zunächst auf -20 °C gefroren und mindestens über Nacht bei -80 °C gelagert.

#### 4.18.4. Schneiden

Vor dem Schneiden wurden Objektträger durch Inkubation in 5 % HCl über Nacht, in 2 % Silan in Aceton, zwei Mal in 2 % Silan in ddH<sub>2</sub>O und schließlich in ddH<sub>2</sub>O für jeweils fünf Minuten silanisiert. Das Silanisieren der Objektträger sorgte für eine bessere Haftung der Gefrierschnitte. Das Kryomikrotom wurde jeweils am Tag zuvor eingeschaltet, um für die Kühlung einen geeigneten Vorlauf zu gewährleisten. Die Raumtemperatur betrug zwischen 18 und 35 °C. Die Kühlung des Objektkopfes wurde auf -16 °C und die Kühlung der Kryostatkammer auf -20 °C eingestellt. Die Schnittdicke wurde auf 12 µm eingestellt, um eine möglichst gute Detektion mit Antikörpern zu ermöglichen und noch genug Zellmaterial zur Analyse des Gewebes zu erhalten. Die Proben wurden aus den Cryomolds geholt und auf die zuvor abgekühlten Probensockel orientiert. Durch Zugabe von etwas Wasser am Boden der Probe wurde das OCT angeschmolzen. Die Proben wurden auf den Peltierelementen des Kryomikrotoms platziert und wieder gefroren. Die gefrorenen Proben wurden auf dem Objektkopf verankert, nah an die Klinge herangeführt und in Schritten von 20-30 µm angetrimmt. Sobald das Gewebe erreicht war, wurden Schnitte zur Auswertung hergestellt. Die Schnitte wurden mit dem silanisierten Objektträger, der während des Schneideprozesses auf Raumtemperatur gehalten wurde, durch Heranführen aufgetragen. Durch das Temperaturgefälle heftet sich die gekühlte Gewebeprobe von allein auf den warmen Objektträger, ohne dass die Probe durch Berühren eventuell beeinflusst wurde. Die Objektträger wurden im Anschluss in eiskaltem Isopropanol für zehn Minuten dehydriert, bevor sie bei Raumtemperatur für zwei Stunden getrocknet wurden.

#### 4.18.5. Antikörperfärbung

##### PBS (10x)

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Die Schnitte wurden auf ihre Qualität und Schnittebene unter mikroskopischer Beobachtung hin selektiert. Die ausgewählten Schnitte wurden mit einem Glasschneider umrandet, um die Menge der benötigten Reagenzien zu minimieren. Die folgenden Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die jeweiligen Schnitte wurden dabei jeweils in einem Volumen von 15  $\mu\text{l}$  inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS-Triton für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Im Anschluss folgte ein Blockierschritt mit 3 % BSA und 5 % Ziegen Serum in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in PBS bei 4 °C über Nacht. Für die Färbung von DNA wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Hoechst in PBS inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte für je 15 Minuten mit PBS und einen Blockierschritt mit 3 % BSA und 5 % Ziegen Serum in PBS. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte im Dunkeln für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Sekundärantikörperlösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 15 Minuten ausgewaschen. Die Schnitte wurden getrocknet und mit Fluoromount-G eingedeckt.

#### 4.19. Bioinformatische Analysen

##### 4.19.1. *In silico* Vorhersage von potentiellen Transkriptionsfaktor Bindestellen

Durch die *in silico* Vorhersage von potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen sollen für Genexpressionsmuster von Enhancerelementen und den damit verbundenen *cis*-regulativen Elementen potentielle als Regulatoren fungierende Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden, um diese anschließend analysieren zu können.

Hierzu wurden Datenbanken genutzt, die experimentell nachgewiesene Bindestellen von Transkriptionsfaktoren führen (Khan et al., 2018; Weirauch et al., 2014). Diese Transkriptionsfaktor Bindestellen (*transcription factor binding sites*, TFBS) liegen dabei als *position weight matrix* (PWM) vor, die angibt mit welcher Wahrscheinlichkeit das Vorkommen einer Base an einer spezifischen Stelle innerhalb einer Sequenz vorliegt, wenn ein Transkriptionsfaktor an diese Sequenz bindet. Mit einer Suchfunktion konnten die DNA-Sequenzen der zu interessierenden Region eingegeben und abgesucht werden. Im Resultat tauchten dabei nur Treffer mit einer Bindewahrscheinlichkeit von mindestens 80 % auf. Diese Treffer wurden mit Phast-Cons Daten (Siepel et al., 2005) weiter selektiert. Bei diesen Daten handelt es sich um Datensätze, die Sequenzen verschiedener Insektenarten mit der entsprechenden Sequenz von *Drosophila melanogaster* vergleichen. Da durch Inversion, Deletion und Duplikation die Länge der zu vergleichenden Region variiert, wurden bei der Erzeugung dieser Werte die Sequenzen aligniert und nach höchster Wahrscheinlichkeit aufgetragen. Die Höhe dieser Werte zeigt an, wie konserviert eine einzelne Base ist und wird als Konservierungswert (*conservation score*) bezeichnet. Mit der Annahme, dass TFBS, die eine wichtige Rolle für die Entwicklung spielen, über die analysierten Insektenarten konserviert sind, wurden die zuvor gefundenen potentiellen TFBSs weiter selektiert. Potentielle TFBSs, die in Ihrer PWM eine bestimmte Base voraussetzen, mussten an diesem Locus einen Konservierungswert (von mindestens 80 % innehaben, um weiter berücksichtigt zu werden.

#### 4.19.2. Darstellung von Proteindomänen

(Letunic and Bork, 2018; Letunic et al., 2012, 2015)

Die Darstellung der Proteindomänen erfolgte mit SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*).

#### 4.19.3. Analyse der Konservierung von Aminosäuresequenzen

Um die Konservierung von Proteinen oder spezifischer Proteindomänen zu analysieren, wurden die Aminosäuresequenzen von Orthologen über verschiedene Datenbanken (uniprot.org/, orthodb.org, ncbi.nlm.nih.gov/protein/, flybase.org/) gesucht und mit Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2018), einem *Multi sequence alignment (MSA) tool*, aligniert. Die MSA Datei wurde durch ConSurf (Ashkenazy et al., 2010, 2016; Celniker et al., 2013) analysiert und die entsprechenden Konservierungswerte dargestellt.

### 4.20. Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen

Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit Image J (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012).

### 4.21. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

#### 4.21.1. Erzeugung von transgenen Fliegen

Die Mikroinjektion von P-Elementen in *Drosophila* Embryonen mit dem Genotyp *white*<sup>1118</sup> wurde von der Firma BestGene Inc. durchgeführt.

#### 4.21.2. Haltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

(Ashburner, 1989)

Die Haltung der Fliegenstämme erfolgte bei Raumtemperatur in einem auf 25 °C eingestellten Wärmeschrank oder in gekühlten Weinschränken bei 18 oder 20 °C. Die Luftfeuchtigkeit wurde dabei zwischen 40 bis 65 % gehalten. Die Vermehrung erfolgte in Kunststoffröhrchen, die mit Maismehl-Agar befüllt (3 cm hoch) und mit Trockenhefe bestreut wurden. Die Fliegen wurden einmal pro Woche auf eine frische Flasche umgesetzt. Nach vier Wochen wurden die gebrauchten Röhrchen über Nacht bei 55 °C inkubiert und für ein bis zwei Tage bei -20 °C eingefroren, um die nicht mehr benötigten Tiere zu eliminieren. Im Anschluss wurde der Inhalt der Röhrchen mit Dampf bei 121 °C im Autoklav sterilisiert und entsorgt.

#### 4.21.3. Kreuzungen

Für das Ansetzen der Kreuzungsexperimente wurden aus der Zucht (4.21.2) Röhrchen der gewünschten Fliegenstämme entnommen. Hierbei wurde die adulte Elterngeneration komplett entfernt, wobei sichergestellt werden musste, dass möglichst viele Nachkommen schlüpfen konnten. Dafür wurden nur Röhrchen genutzt, bei denen schon ausreichend schlupffreie Puppen vorhanden waren. Die schlüpfenden virginellen Weibchen wurden alle acht bis neun Stunden auf ein neues Röhrchen isoliert und mit entsprechenden Männchen gekreuzt. Aufgrund der Tatsache, dass Weibchen erst 6 bis 12 Stunden nach dem Schlüpfen ihre Geschlechtsreife erlangen und dem Fakt, dass Männchen bei einer Raumtemperatur von 20 °C erst nach circa 10 Stunden fertile Spermien produzieren können, war die Virginität der Weibchen gewährleistet. Die Nachkommen mit den gewünschten Merkmalen wurden untereinander gekreuzt und vermehrt.

#### 4.21.4. Balancieren

(Muller, 1918)

Zur Erhaltung oder Etablierung einer letal-rezessiven Mutation wurden Balancer-Chromosomen verwendet, da es ansonsten während der Meiose zur Rekombination kommen konnte und der gewünschte Genotyp verloren gegangen wäre. Bei Balancer-Chromosomen liegen strukturelle Aberrationen (zumeist Inversionen) vor, bei denen es während einer Rekombination zur Entstehung von Chromosomen mit keinem oder zwei Zentromeren kommt. Die daraus resultierenden Embryonen sind letal. Bei *Drosophila melanogaster* sind Balancer für die Chromosomen eins, zwei und drei bekannt, welche die Rekombination auf dem kompletten Chromosom fast vollständig unterdrücken. Darüber hinaus besitzen die meisten Balancer Letalitätsfaktoren, die das Auftreten von homozygot balancierten Tieren im Stamm ausschließen oder minimieren. Balancer-Chromosomen können mit Markern versehen werden, was eine einfache Selektion von heterozygot-balancierten Tieren ermöglicht.

#### 4.21.5. Gal4-UAS-System

(Brand and Perrimon, 1993)

Um die Funktion einzelner Gene und die Rolle dieser Gene in einem Gewebe oder sogar im Organismus nachvollziehen zu können, ist es von Vorteil, die Expression eines bestimmten Gens zeitlich und räumlich sowie quantitativ variieren zu können.

Brand und Perrimon (1993) haben ein System entwickelt, welches mit gezielter Genexpression die selektive Aktivierung eines beliebigen Gens erlaubt. Dieses Zwei-Komponenten-System benötigt einen Transkriptionsfaktor, der nicht in der Fliege vorkommt, aber dennoch die Transkription initiiert. Der aus der Hefe stammende Transaktivator Gal4 ist für diese Aufgabe prädestiniert. Zum einen bindet er sehr spezifisch an eine gut charakterisierte Region im Promotor, der UAS (*upstream activating sequence*), zum anderen kommt ein homologes Protein in der Fliege nicht vor.

Für Versuche mit dem GAL4-UAS-System wurden jeweils Fliegen gekreuzt, bei der ein Geschlecht das Gal4-Konstrukt (auch Treiberlinie genannt) und das andere Geschlecht eine Insertion mit einer UAS-Sequenz, hinter der z.B. ein Reporter gen inseriert werden kann (wird Effektorlinie genannt), trug. Nach der Kreuzung dieser Linien entstehen Nachkommen, bei denen das Zielgen durch das UAS-Gal4-System exprimiert wird. Unter der Bedingung, dass der dem Gal4-Gen vorgeschaltete Enhancer aktiv ist, wurde auch das Reporter gen abgelesen.

#### 4.21.6. RNAi-Induktion

(Hannon, 2002; Perrimon et al., 2010)

Durch RNA Interferenz kann der in Eukaryoten vorkommende, endogene, post-transkriptionelle Genregulationsmechanismus gestört werden, um die Translation bestimmter Gene zu minimieren. Der Mechanismus wird durch das gezielte Einbringen von dsRNA induziert. Durch Verwendung des Gal4-UAS-Systems (4.21.5) konnte ein gezielter Knockdown des Zielgens durch UAS-RNAi Effektorlinien in den durch die Treiberlinie festgelegten Geweben und Zeitpunkten induziert werden.

#### 4.21.7. Ablage der Embryonen

Fliegen mit dem gewünschten Genotyp wurden für die Ablage der Embryonen auf Röhrchen mit Traubensaftagar gesetzt (3.6), welche mit etwas Hefe bedeckt waren. Die Eiablage erfolgte über einen Zeitraum von 8-16 Stunden bei ca. 25 °C. Die Fliegen konnten nach diesem Zeitraum jeweils auf ein frisches, mit Traubensaftagar gefülltes Röhrchen, umgesetzt werden, bis die gewünschte Menge Embryonen gewonnen war. Die Ablagen wurden bei 4 °C gelagert, um die Weiterentwicklung zu stoppen, und spätestens nach drei Tagen fixiert (4.21.8).

#### 4.21.8. Entchorionisierung und Fixierung von Embryonen

##### **PBS (10x)**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### **NaCl-Triton**

120 mM NaCl, 0,02 % (v/v) Triton X-100

##### **F-PBS**

4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS

##### 4.21.8.1. Entchorionisierung

Embryonen aus Ablageflaschen (4.21.7) wurden mit NaCl-Triton überschichtet, mit einem Pinsel vom Traubensaft-Agar gelöst und daraufhin in ein Stahldrahtkörbchen (Maschenweite: 160 µm) überführt. Dort wurden sie mehrfach mit NaCl-Triton gewaschen und mit 1:1 verdünntem Klorix (50 % Klorix) für fünf Minuten entchorionisiert. Der Grad der Chorionauflösung wurde mit einer Lupe kontrolliert. Nach der Entchorionisierung wurden die Embryonen erneut mehrfach mit NaCl-Triton gewaschen. Die entchorionisierten Embryonen wurden mithilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein Eppendorfggefäß überführt.

##### 4.21.8.2. Fixierung mit Formaldehyd

Der wässrige Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zu den Embryonen wurde im Anschluss zuerst 500 µl F-PBS und danach 500 µl n-Heptan gegeben. Im Folgenden wurden die Embryonen für 20 Minuten auf einem Schüttler bei 200 UpM fixiert. Dabei wurden die Embryonen kräftig an der Phasengrenze bewegt. Anschließend wurden zuerst die untere wässrige Phase und danach die obere Heptanphase abgenommen, bevor die Embryonen zweimal mit n-Heptan gewaschen wurden. Der Überstand wurde danach erneut verworfen. Um die Vitellinhülle abzulösen, wurden daraufhin 500 µl n-Heptan und 500 µl Methanol zugegeben. Im Anschluss wurden die Embryonen für zwei Minuten bei 2850 UpM geschüttelt. Nach dem Absaugen der Vitellinhüllen und den nicht-entvitellinisierten Embryonen wurden die restlichen Embryonen, die sich nach der Entvitellinisierung am Boden des Gefäßes sammelten, dreimal mit Methanol gewaschen und konnten für einige Zeit bei 4 °C aufbewahrt werden.

#### 4.21.9. Fixierung von Larven und Puppen

(Klein, 2008)

##### **10x PBS**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### **PBS-T**

1x PBS, 0,1 % Triton pH 7,4

##### **F-PBS-T**

4 % Formaldehyd in 1x PBS, 0,1 % Triton

Für die Fixierung von Larven und Puppen wurde das gewünschte Gewebe in PBS freipräpariert und mit F-PBS-T für 20 Minuten fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe für jeweils 15 Minuten in PBS-Triton.

#### 4.21.10. *Ex vivo* Analyse von Hämocyten

##### **10x PBS**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### **PBS-T**

1x PBS, 0,1 % Triton pH 7,4

Schneider Medium (Sigma-Aldrich)

Um Hämocyten aus der Hämolymphe zu gewinnen und zu analysieren, wurden Larven oder Puppen des gewünschten Stadiums in 20 µl Schneider Medium aufpräpariert, das Gewebe wurde in der Lösung geschwenkt und anschließend entfernt. Die Hämocyten wurden für 30 Minuten inkubiert, damit sie auf den Boden absinken und adherieren konnten. Anschließend wurde 2 µl 37 %-iges Formaldehyd zugegeben und die Hämocyten für 15 Minuten fixiert. Die Hämocyten wurden drei Mal für je zehn Minuten mit PBS-Triton gewaschen und permeabilisiert und konnten im Anschluss wie unter 4.21.12 oder 4.21.15 gefärbt werden.

#### 4.21.11. *In situ* Hybridisierung

(Hauptmann et al., 2016; Lécuyer et al., 2008; Legendre et al., 2013; Tautz and Pfeifle, 1989)

Um Genexpression nachverfolgen zu können, wurde die mRNA Verteilung in *whole mount* Präparaten mittels *in situ* Hybridisierung analysiert.

##### 4.21.11.1. Präparation der Embryonen

##### **10x PBS**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### **PTW**

1x PBS, 0,2 % Tween20 pH 7,4

##### **F-PBS**

4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS

**Hybridisierungspuffer**

50 % (w/v) Formamid deionisiert, 5 % SSC, 0.05 % Heparin, 0.1 % Tween 20, pH 6,5

**AP Puffer 9,5**

0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>

**NBT-Lösung**

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat in 100 % Dimethylformamid

**BCIP-Lösung**

75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumsals in 70 % Dimethylformamid

**Glycin** (Stammlösung: 40 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O)

Fixierte und entvitellinierte Embryonen wurden durch mehrfaches Waschen in PTW rehydriert und für 20 Minuten bei 200 UpM mit F-PBS nachfixiert und drei Mal für je fünf Minuten mit PTW gewaschen. Danach wurden die Embryonen mit 3 µg/ml Proteinase K in PTW für 13 Minuten mit mehrfachem Invertieren des Gefäßes bei Raumtemperatur und darauffolgend einer Stunde auf Eis permeabilisiert. Die Proteinase K Aktivität wurde durch zweimaliges Waschen mit 2 mg/ml Glycin in PTW für je fünf Minuten gestoppt. Es folgte eine weitere Nachfixierung mit 4 % F-PBS für 20 Minuten. Die Embryonen wurden fünfmal für je zwei Minuten mit PTW gewaschen. Anschließend wurde für 10 Minuten in 500 µl PTW und 500 µl Hybridisierungspuffer und darauffolgender Inkubation in 1 ml Hybridisierungspuffer umgepuffert. Die Embryonen wurden darin bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert oder sofort weiter genutzt.

## 4.21.11.2. Hybridisierung

In einem separaten Eppendorfgefäß wurden 400 µl Hybridisierungspuffer bei 100 °C gekocht, anschließend für mindestens fünf Minuten abgekühlt und als Prähybridisierungspuffer genutzt. Der Hybridisierungspuffer, welcher sich im Ansatz mit den Embryonen befand, wurde abgenommen und der abgekühlte Prähybridisierungspuffer zum Ansatz zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens zwei Stunden bei 56 °C im Hybridisierungssofen. 100 µl der Sondenlösung (2-10 ng/ml) wurden bei 80 °C für drei Minuten erhitzt und für mindestens fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde durch die Sondenlösung ersetzt. Die Ansätze inkubierten für 12-16 Stunden. Die Waschlösungen wurden zeitgleich auf 56 °C vorgeheizt.

## 4.21.11.3. Stringenzwaschen

**10x SSC**

3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7,3

Die Sondenlösung wurde abgenommen und gegebenenfalls wiederverwendet. Alle folgenden Waschschrte erfolgten mit den vorgeheizten Waschlösungen im Hybridisierungssofen auf 56 °C. Die Embryonen wurden mit 400 µl Hybridisierungspuffer gespült und für 30 Minuten gewaschen. Darauf folgten zehnmünütige Waschschrte mit Lösungen, die Verhältnisse von jeweils 3:1, 1:1 und 1:3 Hybridisierungspuffer zu 2x SSC (v/v) hatten. Anschließend wurde einmal in 2xSSC und drei Mal in 0,2x SSC für je 20 Minuten gewaschen, bevor fünfminütige Waschschrte mit einem jeweiligen Verhältnis

von 3:1, 1:1 und 1:3 0,2x SSC zu PTW (v/v) erfolgten. Die Proben wurden abschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### 4.21.11.4. Antikörperfärbung

Die Embryonen wurden zwei Mal auf Raumtemperatur für fünf Minuten mit PTW gewaschen und danach mit Blockpuffer in PTW für 30 Minuten geblockt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte bei 100 UpM schüttelnd in PTW verdünnten Blockpuffer über Nacht bei 4 °C. Der Antikörper wurde danach jeweils zunächst mit drei fünfminütigen Waschschritten mit PTW ausgewaschen und dann mit AP Puffer umgepuffert. 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP wurden in kaltem AP Puffer verdünnt und die Färbereaktion mit dieser Lösung im Dunkeln bei 4 °C gestartet. Bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch mehrfaches Waschen mit PTW gestoppt. An dieser Stelle konnte die Detektion von Proteinen mittels DAB-Nachweises erfolgen (4.21.13.2). Die Embryonen wurden aufsteigenden EtOH-Reihe dehydriert und abschließend mit Euparal eingedeckt.

#### 4.21.12. Antikörperfärbung an Embryonen

##### 4.21.12.1. Immunhistochemischer Nachweis

Fixierte und entvitellinierte Embryonen (4.21.8) wurden durch mehrfaches Waschen in PTW rehydriert und anschließend in 200 µl in PTW verdünnten primären Antikörper (3.8.1) über Nacht und schüttelnd bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgenommen, Hoechst als DNA Farbstoff in PTW verdünnt und die Embryonen damit 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbelösung wurde durch drei Waschschrritte mit PTW für je 15 Minuten ausgewaschen. Die Embryonen wurden mit 5 % Ziegen Serum in PTW blockiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (3.8.2) erfolgte im Dunkeln für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einem Volumen von 200 µl. Der Sekundärantikörper wurde durch fünf 15-minütige Waschschrritte ausgewaschen. Die Embryonen wurden mit Fluoromount-G eingedeckt und nach dem Aushärten analysiert.

##### 4.21.12.2. Histochemischer Peroxidasenachweis

(Hsu et al., 1981)

#### **DAB Lösung**

25 mg/ml Diaminobenzidin (DAB) (w/v) in 1xPBS

#### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung**

0,3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PTW

Die Embryonen werden zunächst wie unter 4.21.12.1 behandelt und mit einem biotinylierten Sekundärantikörper markiert. Die Inkubation muss hierbei nicht im Dunkeln erfolgen. Der Sekundärantikörper wurde durch drei Waschschrritte mit PTW für je 15 Minuten ausgewaschen. Währenddessen wurden die Lösungen A und B aus dem ABC-Kit jeweils 1:100 in PTW verdünnt und 30 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung von Avidin mit Biotin zu ermöglichen. Im Anschluss wurde die Avidin-Biotin Lösung auf die Embryonen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die Embryonen wurden drei Mal für 15 Minuten ausgewaschen. Die DAB Lösung wurde auf die Embryonen gegeben und durch Zugabe von 20 µl der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch mehrfaches Waschen mit PTW gestoppt. Die Inaktivierung der Materialien, die mit der DAB Lösung in Kontakt gekommen sind, erfolgte durch bespülen mit 50 %-igem Klorix in ddH<sub>2</sub>O. Die

Embryonen wurden im Anschluss in einer aufsteigenden EtOH Reihe dehydriert und im Anschluss in Euparal eingebettet.

#### 4.21.13. Antikörperfärbung von Larven und Puppen

Larvales und pupales Gewebe wurde im Anschluss ohne Lagerung nach dem Fixieren und den darauffolgenden Waschschritten gefärbt. Die Proben wurden zunächst mit 0,5 % BSA in PTW geblockt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem Volumen von 200-500 µl. Die Antikörperlösung wurde abgenommen, Hoechst (3.9) als DNA Farbstoff in PTW verdünnt und das Gewebe damit 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbelösung wurde durch drei Waschschrritte mit PTW für je 15 Minuten ausgewaschen. Im Anschluss folgte das Blockieren mit 0,5 % BSA und 5 % Ziegen Serum in PTW für 30 Minuten. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (3.8.2) erfolgte im Dunkeln für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einem Volumen von 200-500 µl. Der Sekundärantikörper wurde durch fünf 15-minütige Waschschrritte ausgewaschen. Die Gewebe wurden in DABCO-Glycerin überführt und mit einer aufsteigenden Konzentration (30 %, 50 %, 70 % Glycerin in ddH<sub>2</sub>O) jeweils über Nacht bei 4 °C ohne Bewegung inkubiert. Die Gewebe wurden mit Fluoromount-G eingedeckt und nach dem Aushärten analysiert.

#### 4.21.14. Phalloidin-Färbung an Larven und Puppen

Für die Visualisierung von F-Actin in sich bildende Muskelfasern wurden larvale und pupale Gewebe zeitgleich mit der Inkubation des Primärantikörpers (4.21.13) mit Fluoreszenzgekoppelten Phalloidin (3.9) gefärbt.

#### 4.21.15. X-Gal-Färbung

##### **Fixierlösung**

0,7 % (v/v) Glutaraldehyd in 1x PBS

##### **10x PBS**

1,38 M NaCl, 30 mM KCl 0,02 % (v/v), 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### **X-Gal-Färbelösung**

8 % (w/v) 5-Br-4-Cl-3-indoxyl-β-D-Galaktosidase, in Dimethylformamid, 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,1 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 3,1 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (w/v), 0,3 % (v/v) Triton X-100

Die präparierten Larven oder Puppen wurden für 20 Minuten mit der Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mehrfach in PBS gewaschen. Für die Färbung der β-Galaktosidase wurden die Proben in die Färbelösung mit 8 % X-Gal überführt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei ausreichender Färbung wurden die Proben erneut mehrfach in PBS gewaschen und in 50 % Glycerin in 1x PBS überführt. In dieser Lösung konnte das Gewebe präpariert werden. Die Proben wurden schließlich in DPX eingebettet.

#### 4.21.16. Allelietest

Mit einem Allelie- oder Komplementationstest kann geprüft werden, ob zwei Mutationen das gleiche Gen beeinflussen.

In dieser Arbeit wurden P-Element induzierte Insertionen verwendet, die Letalität hervorrufen und in einem genomischen Locus liegen, der untersucht werden soll. Da P-Elemente häufig mehrfach Insertionen verursachen, sollte durch ein Allelietest getestet werden, ob die jeweilige Insertion auch

im transheterozygoten Zustand zu Letalität führt. Dafür wurden Mutationen verwendet, die bereits detailliert untersucht wurden. Durch Kreuzung (4.21.3) der jeweiligen balancierten Stämme konnte die F1 Generation auf Vorkommen von nicht balancierten Tieren untersucht werden.

#### 4.21.17. Letalitätstest

Um zu bestimmen, wie sich eine Mutation auf die Letalität distinkter Entwicklungsstadien auswirkt, wurden Embryonen, Larven und Puppen eines entsprechenden Genotyps abgesammelt, auf mit Traubensaft-Agar bedeckte Petrischalen überführt und der Prozentsatz der Tiere ermittelt, die sich bis zum nächsten Entwicklungsstadium entwickelt haben. Diese Ansätze wurden darüber hinaus mit steigendem Alter der Elterntiere verfolgt.

##### 4.21.17.1. Embryonale Letalität

Um die embryonale Letalität zu ermitteln, wurden Embryonen von Ablageflaschen genutzt, bei denen die Elterntiere bereits mindestens zwei Tage zwei Mal täglich umgeklopft wurden, um eine kontinuierliche Eiablage zu stimulieren (4.21.7). Das gesamte Experiment wurde bei konstanten 25 °C durchgeführt. Die 0-16 Stunden alten Embryonen wurden mit einer Mikrospritze vorsichtig auf die Petrischale transferiert. Pro Schale wurden 50 Embryonen platziert. Die Werte aus einer Ablage wurden als ein biologisches Replikat behandelt und gemittelt. Für weitere biologische Replikate wurden neue Ablagen mit anderen Elterntieren genutzt. Die Auswertung der embryonalen Letalität erfolgte mindestens 24 Stunden nach dem Transfer auf die Petrischalen. Zur Ermittlung der embryonalen Letalität wurden nicht geschlüpfte Embryonen ausgezählt.

##### 4.21.17.2. Larvale Letalität

Zur Ermittlung der larvalen Letalität wurden die Larven aus den Versuchsansätzen der Ermittlung der embryonalen Letalität genutzt. Die Larven wurden täglich mit einigen Brocken Hefe respektive Maismehlagar gefüttert und die Schalen täglich mit einem Tropfen Wasser befeuchtet. Die larvale Letalität wurde durch Auszählung der sich entwickelten Puppen nach mindestens sieben Tagen ermittelt.

##### 4.21.17.3. Pupale Letalität

Zur Ermittlung der pupalen Letalität wurden die Puppen aus den Versuchsansätzen der larvalen Letalität genutzt. Die Schalen wurden täglich mit einem Tropfen Wasser befeuchtet. Die Auswertung der pupalen Letalität erfolgte nach mindestens sieben Tagen durch Auszählung der nicht-geschlüpfen Puppen.

#### 4.21.18. Fertilitätstest

##### 4.21.18.1. Fertilitätstest an Weibchen

Um die Fertilität von Weibchen zu untersuchen, wurden virginelle Tiere des gewünschten Genotyps abgesammelt und mit jungen Männchen des Kontrollgenotyps  $w^{1118}$  verpaart (4.21.3) und auf Ablageflaschen bei 25 °C gehalten. Nach erreichtem Zielalter der Eltern wurden die Ablagen für mindestens zwei Stunden bei 25 °C inkubiert, um eine Weiterentwicklung zu ermöglichen. Die aus den Ablagen gewonnenen Eier (4.21.3) wurden entchorionisiert, fixiert und entvitellinisiert (4.21.8). Die Eier wurden direkt in PTW überführt, mit Hoechst gefärbt, gewaschen und anschließend ausgewertet. Eier, in denen keine DNA Färbung zu detektieren war, wurden als nicht befruchtet interpretiert.

#### 4.21.18.2. Fertilitätstest an Männchen

Für die Bestimmung der Fertilität von Männchen wurden frisch geschlüpfte Männchen des gewünschten Genotyps gesammelt. Nach entsprechender Entwicklungsdauer bei 25 °C wurde ein einziges Männchen mit jeweils fünf virginellen Weibchen des Kontrollgenotyps  $w^{1118}$  verpaart und auf Flaschen mit Maismehlagar bei 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit um ca. 60 % gehalten. Männchen in Ansätze, bei denen auch nach mindestens sieben Tagen keine Larven zu detektieren waren, wurden als steril angesehen.

#### 4.21.19. Bestimmung von Entwicklungsstadien

Die Bestimmung der jeweiligen embryonalen Entwicklungsstadien richtete sich nach Hartenstein, 1993. Larven im dritten Stadium wurden nach ihrer Größe ausgewählt. Puppenstadien wurden nach Bainbridge and Bownes, 1981 bestimmt. Die Stadien der Oozyten wurden nach Spradling, 1994 bestimmt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Die transkriptionelle Regulation und die gewebespezifische Expression von *Laminin B1* und *Laminin B2* ist abhängig von Serpent/dGATAB

#### 5.1.1. Die Reporterexpression von *Laminin B1* und *Laminin B2*

Die Quelle für eine frühe embryonale ECM muss von den Geweben selbst generiert werden und kann nicht von der später eintretenden embryonalen Sekretion durch Hämocyten oder den Fettkörper stammen. Um diese Ausbildung der frühen gewebespezifischen ECM *in vivo* zu charakterisieren, wurden die *Laminin B1* und *Laminin B2* Gene für die Untersuchungen ausgewählt, welche für die Laminin  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten codieren.

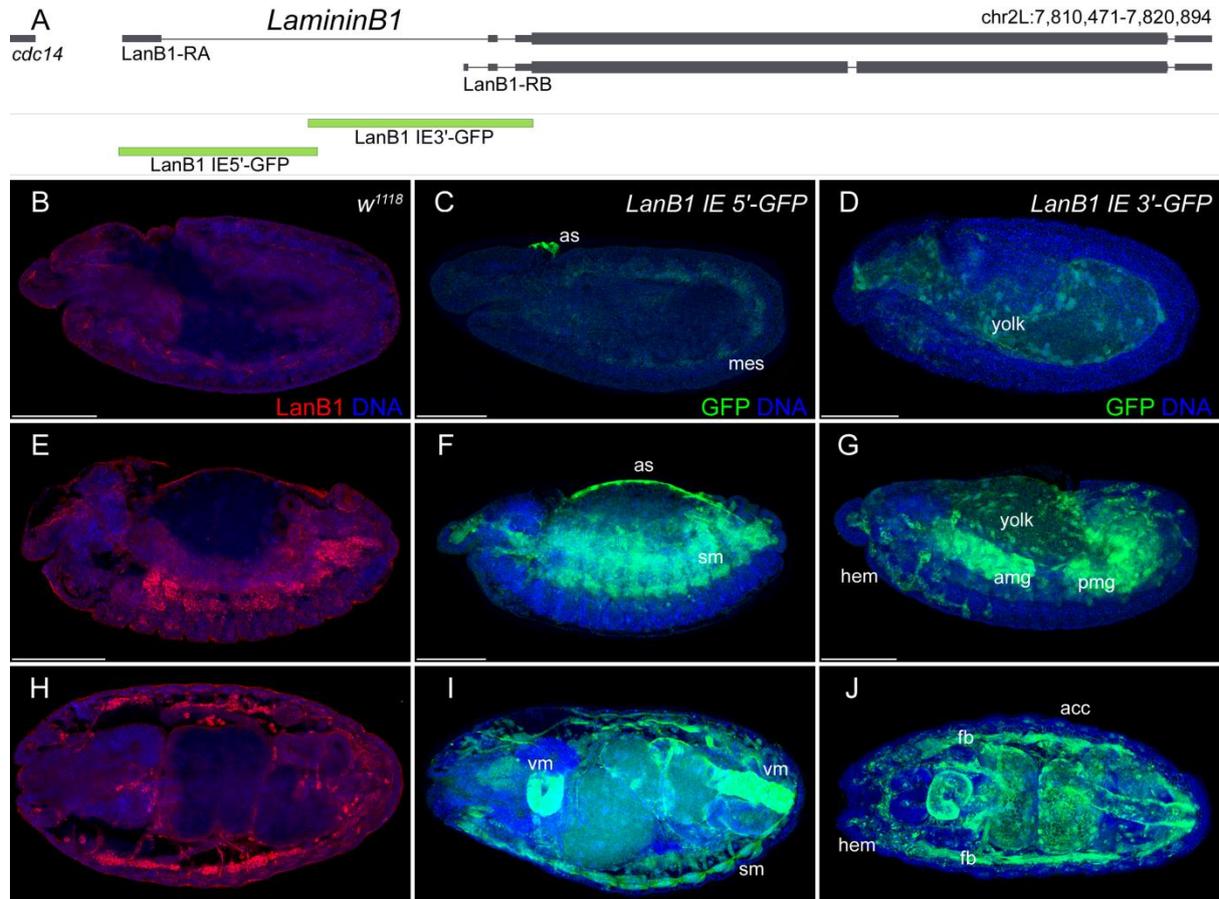
Beide Gene besitzen kleine *upstream* (*upstream enhancer*, UE) und große intronische (*intrinsic enhancer*, IE) Enhancer. Bioinformatische Analysen der großen ersten Introns decken mehrere konservierte Regionen innerhalb dieser Enhancer auf, was auf *cis*-regulative Module (CRM) hindeutet. Lediglich *LanB2* zeigt eine kleine konservierte Region im entsprechenden UE. Daher wurden Transgene beider Laminine generiert (Konstrukte für *LanB2* in Bischoff, 2016; Konstrukte für *LanB1* in dieser Arbeit), die den großen IE in 5' und 3' Konstrukte unterteilen und ein *LanB2 UE* Konstrukt generiert (Abb. 5 und 6).

Die IE 5' Konstrukte zeigten beide Expression in Zellen des frühen Mesoderms sowie Expression in der Amnioserosa (*LanB1 IE 5'* in Abb. 5C, F und *LanB2 IE 5'* in Abb. 6C, F). Am Ende der Embryonalentwicklung zeigten die 5' Konstrukte Expression in Zellen der somatischen Muskulatur (*LanB1 IE 5'* in Abb. 5I und *LanB2 IE 5'* in Abb. 6I), während die Expression in der viszeralen Muskulatur durch die *LanB1 IE 5'* und *LanB2 IE 3'* Konstrukte widerspiegelt wurde (*LanB1 IE 5'* in Abb. 5I und *LanB2 IE 3'* in Abb. 6J). In den *LanB1 IE 3'* und *LanB2 IE 5'* Konstrukten konnte Expression der entodermalen Mitteldarmprimordien detektiert werden (*LanB1 IE 3'* in Abb. 5G und *LanB2 IE 5'* in Abb. 6F). Darüber hinaus zeigten die *Lan IE 3'* Konstrukte Expression in Zellen des peripheren Nervensystems (PNS), bei denen es sich möglicherweise um Nebenzellen (*accessory cells*) handelt (*LanB1 IE 3'* in Abb. 5J und *LanB2 IE 3'* in Abb. 6J), in dorsalen Mittelzellen (*dorsal median cells*, DMCs, nicht gezeigt) und im Dotter (*LanB1 IE 3'* in Abb. 5D, G, J und *LanB2 IE 3'* in Abb. 6D, G, J). Laminin Reporterexpression in Hämocyten und im Fettkörper konnte ab der frühen Differenzierung dieser Gewebe detektiert werden und wurde durch das *LanB2 IE 5'* (*LanB2 IE 5'* in Abb. 6F, I) und der 3' Konstrukte von *LanB1* und *LanB2* widerspiegelt (*LanB1 IE 3'* in Abb. 5G, J und *LanB2 IE 3'* in Abb. 6G, J). Der *LanB2 UE* zeigte eine kleine konservierte Region (Abb. 10), doch Expressions-Analysen zeigten keine embryonale Reporterexpression, was darauf hindeutet, dass keine CRM für embryonale Expression im UE von *LanB2* vorhanden sind.

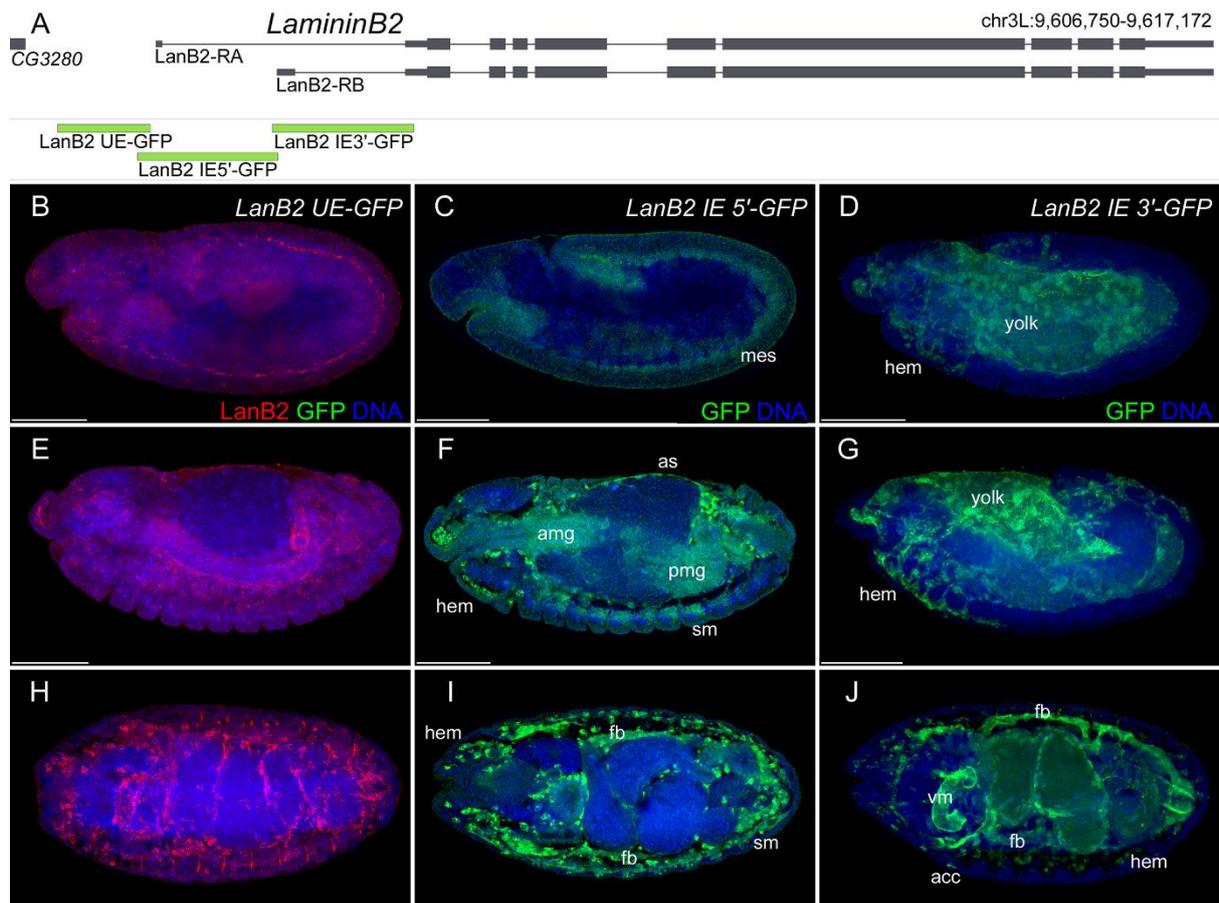
Die vergleichende Proteinverteilung von *LanB1* und *LanB2* erscheint zuerst in einer Schicht zwischen dem Mesoderm und dem Ektoderm in Embryonen des voll verlängerten Keimstreifes und wird danach in mesodermalen sowie entodermalen Zellen verstärkt exprimiert. Gegen Ende der Embryonalentwicklung umgeben *LanB1* und *LanB2* die meisten inneren Gewebe und werden stark von Hämocyten und Fettkörper sekretiert (*LanB1* in Abb. 5B, E, H und *LanB2* in Abb. 6B, E, H).

Jedes Gewebe, in dem *LanB1* und *LanB2* am Ende der Embryonalentwicklung zu detektieren ist, scheint in der Lage zu sein, Laminin von sich aus zu exprimieren. Interessanterweise konnte die

Expression von mesodermalen, entodermalen und Zellen des ektodermalen Darmparts sowie in der Amnioserosa in allen diesbezüglichen Zellen detektiert werden, während die Laminin-Schicht, welche das PNS und ZNS umgibt, ausschließlich von einzelnen Zellen des PNS bzw. von dorsalen Mittelzellen (DMCs) und daran anschließender Sekretion von Hämocyten und dem Fettkörper stammte.



**Abbildung 5: Embryonale Expression von *Laminin B1* Reporter-Gen-Konstrukten.** (A) Schematische Repräsentation der genomischen Region von *LanB1* und den abgeleiteten Reporter-Gen-Konstrukten. (B, E, H) Protein Verteilung von LanB1 (rot) in *white<sup>1118</sup>* (*w<sup>1118</sup>*) Embryonen. (C, F, I) Reporter-Gen-Expression (grün) des *LanB1 IE 5'-GFP* Konstrukts. (D, G, J) Reporter-Gen-Expression (grün) des *LanB1 IE 3'-GFP* Konstrukts. (B-D) Embryonen im Stadium 11 (Lateralansicht). (E-G) Embryonen im Stadium 14 (Lateralansicht) und (H-J) Embryonen im Stadium 16 (Dorsalansicht). (B-J) DNA Färbung in blau. Abkürzungen: acc: Nebenzellen (*accessory cells*), as: Amnioserosa, amp and pmg: anteriores and posteriores Mitteldarmprimordium, fb: Fettkörper (*fat body*), hem: Hämocyten, mes: Mesoderm, sm: somatische Muskulatur, vm: viszerale Muskulatur. Messbalken = 100 µm.



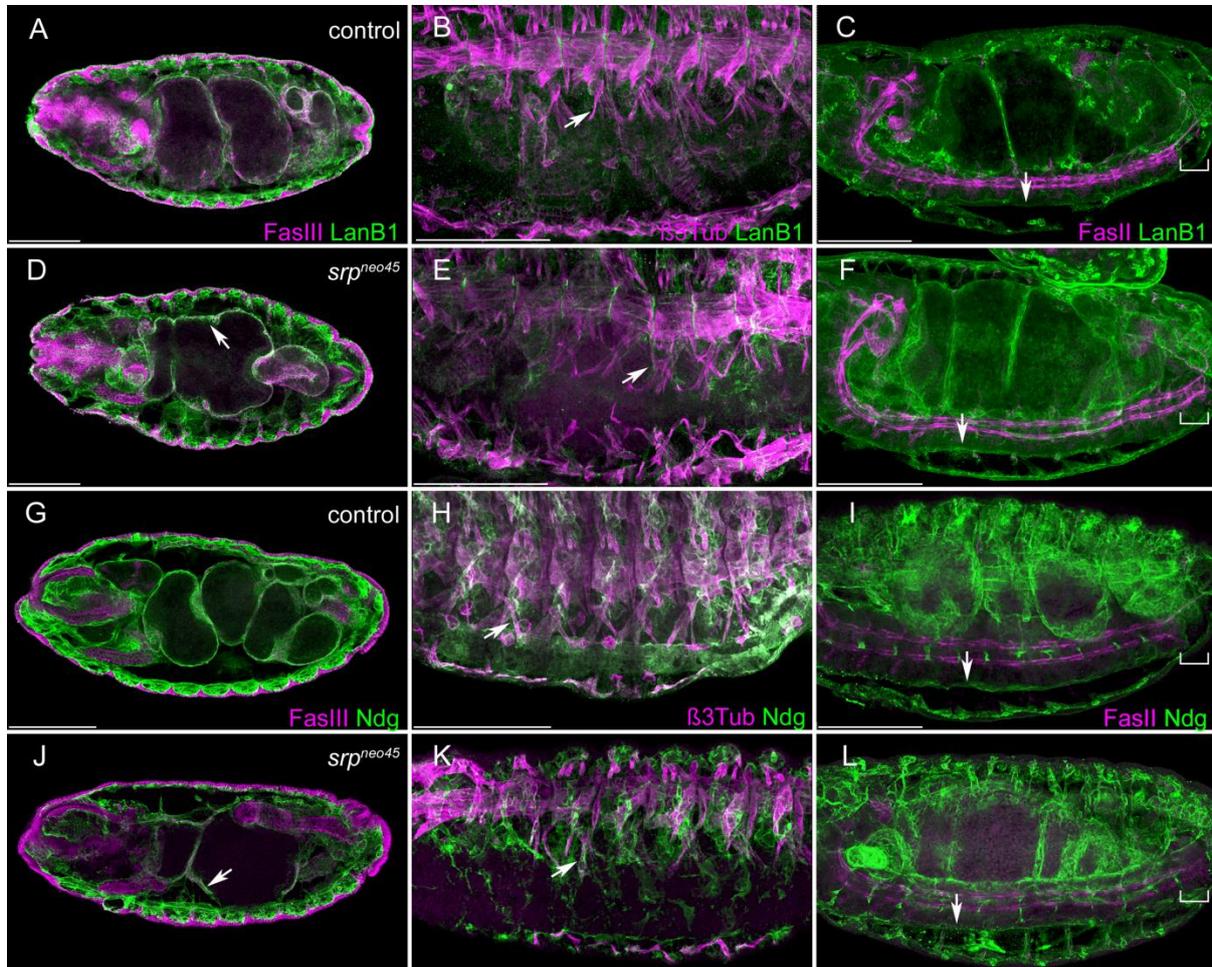
**Abbildung 6: Embryonale Expression von *Laminin B2* Reporter-Gen-Konstrukten.** (A) Schematische Repräsentation der genomischen Region von *LanB2* und den abgeleiteten Reporter-Gen-Konstrukten. (B, E, H) Reporter-Gen-Expression (grün) des *LanB2 UE-GFP* Konstrukts und LanB2 Protein-Verteilung (rot). (C, F, I) Reporter-Gen-Expression (grün) des *LanB2 IE 5'-GFP* Konstrukts. (D, G, J) Reporter-Gen-Expression (grün) des *LanB2 IE 3'-GFP* Konstrukts. (B-D) Embryonen im Stadium 11 (Lateralansicht). (E-G) Embryonen im Stadium 14 (Lateralansicht) und (H-J) Embryonen im Stadium 16 (Dorsalansicht). (B-J) DNA Färbung in blau. Abkürzungen: acc: Nebenzellen (*accessory cells*), as: Amnioserosa, amp and pmg: anteriores and posteriores Mitteldarmprimordium, fb: Fettkörper (*fat body*), hem: Hämocyten, mes: Mesoderm, sm: somatische Muskulatur, vm: viszerale Muskulatur. Messbalken = 100 µm.

### 5.1.2. Die Abwesenheit von Hämocyten offenbart eine frühe gewebespezifisch produzierte ECM

Um die Rolle der frühen gewebespezifischen Expression von *LanB1* und *LanB2* für eine ECM Bildung zu analysieren, wurde untersucht, welche Expressions-Quelle für Laminine essentiell für die Bildung eines initialen Laminin-Netzwerkes ist. Um dieser Fragestellung nach zu gehen, wurde die Verteilung von Laminin und Nidogen, als Indikator früher ECM-Assemblierung, untersucht. Für diesen Ansatz wurde das hypomorphe *srp<sup>neo45</sup>* Allel benutzt, welches lediglich die Differenzierung der Hämocytenanlage beeinflusst, während die Differenzierung des Mitteldarms, der Amnioserosa und des Dotters nicht gestört ist (Cooley et al., 1988; Rehorn et al., 1996).

Die Organe im *Drosophila* Embryo waren sowohl im wildtypischen als auch im *srp<sup>neo45</sup>* mutanten Hintergrund mit einer Schicht aus Laminin und Nidogen umgeben (Abb. 7A-F, G-L). Die gewebespezifische Sekretion von Laminin reicht also aus, um eine frühe ECM zu initiieren. Ohne Laminin-Sekretion von Hämocyten entwickelten sich der Mitteldarm, die somatische Muskulatur und

das ZNS (ZNS) normal. Allerdings ist die terminale Differenzierung gestört. Die Differenzierung des Mitteldarms ist durch fehlende oder abnormal verlaufende Kammerung charakterisiert (Abb. 7D, J, Pfeile), während die somatische Muskulatur Orientierungsdefekte der ventralen Myotuben zeigt (Abb. 7E, K Pfeile) und das ZNS unvollständig kondensiert (Abb. 7C, F, I, L, Klammern). Die Markierung von Ndg in Abwesenheit von Hämocyten deutet auf ein funktionelles Laminin-Netzwerk, in dem Laminin und Ndg interagieren.



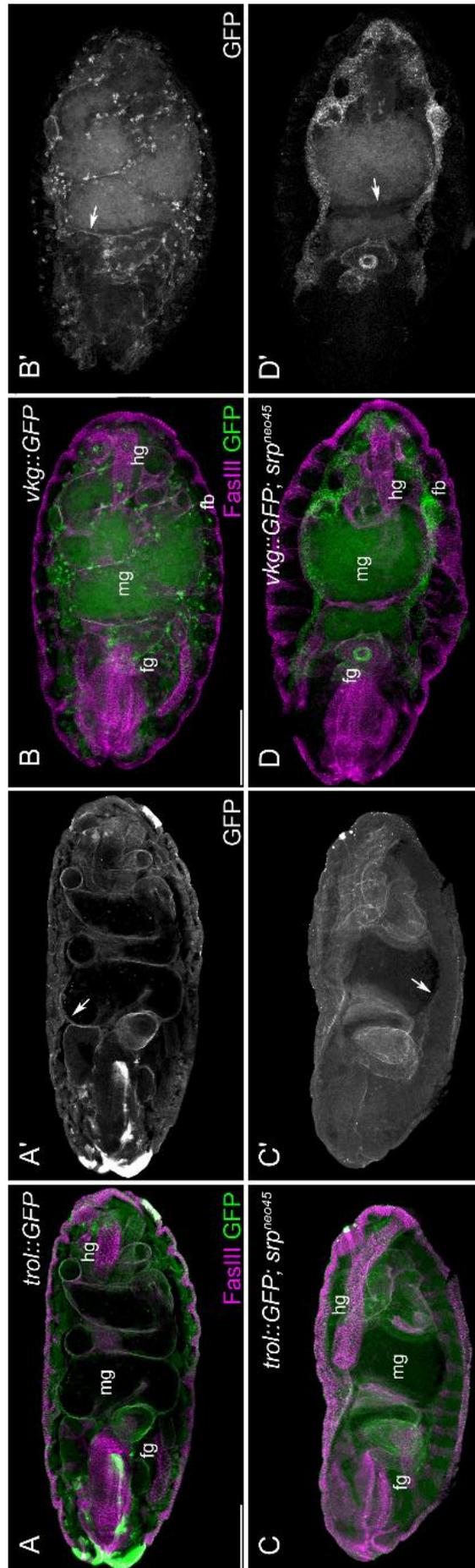
**Abbildung 7: Die gewebespezifische Laminin-Sekretion reicht für eine frühe embryonale ECM aus. (A-C, G-I) Kontrollen und (D-F, J-L)  $srp^{neo45}$  Mutanten. (A-F) LanB1 (grün) und (G-L) Ndg (grün) Antikörper Färbung zusammen mit FasIII (magenta) (A, D, G, J) zur Analyse der Mitteldarm Morphologie,  $\beta$ 3-Tubulin ( $\beta$ 3Tub) (magenta) (B, E, H, K) zeigt die Morphologie der Muskulatur und FasII (magenta) (C, F, I, L) zeigt die Morphologie des ZNS.  $srp^{neo45}$  Embryonen zeigen Defekte in der Mitteldarmkammerung (D, J), der Anordnung der ventralen Myotuben (E, K) und der Kondensation des ZNS (F, L). Messbalken = 100  $\mu$ m.**

Das Linkerprotein Perlecan und Kollagen IV stellen weitere essentielle Komponenten der Basallamina dar. Die Analyse der Proteinverteilung dieser beiden Komponenten in  $srp^{neo45}$  Mutanten wurde mit Exontrap Fliegenlinien durchgeführt, die eine wildtypische Verteilung der nativen Proteine widerspiegeln (Morin et al., 2001; Pastor-Pareja and Xu, 2011).

Die Proteinverteilung von Perlecan und der von *viking* codierten Kollagen IV Untereinheit umgaben in wildtypischen Embryonen die ektodermalen Darmkompartimente des Vorder- und Enddarms sowie die des entodermalen Mitteldarms (Abb. 8A-B'). Bei Verlust von Hämocyten konnte die

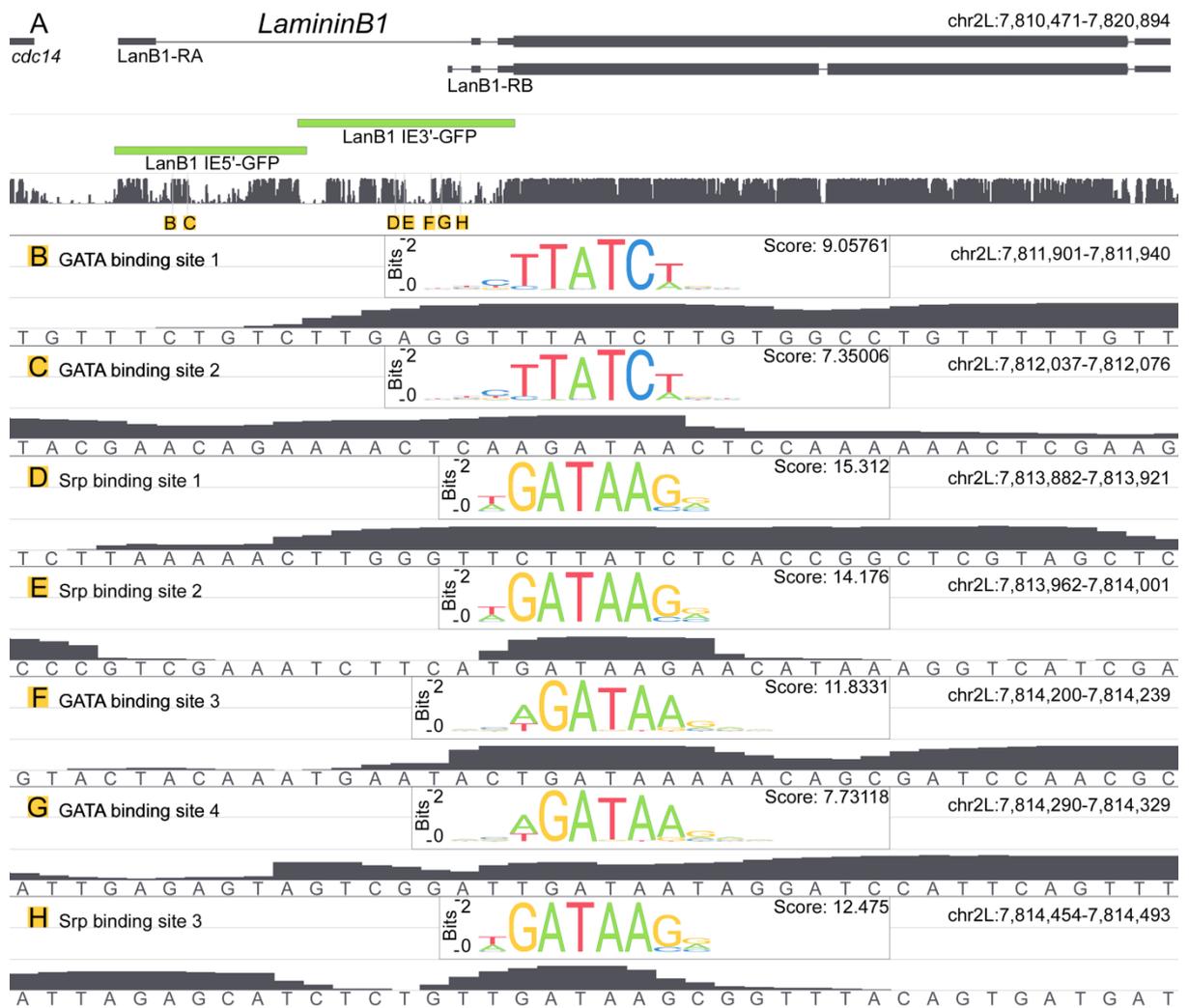
Proteinverteilung von Perlecan um den ektodermalen Darm detektiert werden. Die Verteilung um den Mitteldarm war nur schwach und unterbrochen zu detektieren (Abb. 8C und C'). Im Fall von *Vkg* war das Protein ebenfalls um den Vorder- und den Enddarm detektierbar. Am Mitteldarm konnte kein Signal detektiert werden (Abb. 8D und D').

**Abbildung 8 (nachfolgende Seite): Proteinverteilung von Perlecan und Kollagen IV in Abwesenheit von Hämozyten. (A-B')** Kontrolltiere mit dem Genotyp *trol::GFP;+/TM3 Dfd-YFP (A und A')* und *vkg::GFP (B und B')*. **(C-D')** *srp<sup>neo45</sup>* Mutanten mit den Genotyp *trol::GFP; srp<sup>neo45</sup> (C und C')* und *vkg::GFP; srp<sup>neo45</sup> (D und D')*. GFP (grün) **(A, B, C, D)** (weiß) **(A', B', C', D')** und FasIII Antikörperfärbung (magenta) **(A, B, C, D)**. In wildtypische Embryonen sind sowohl ektodermale wie auch entodermale Darmkompartimente von Perlecan (A und A') und Viking (B und B') umgeben. In *srp<sup>neo45</sup>* Mutanten sind Signale im Bereich der ektodermalen Darmkompartimente von Perlecan (C und C') und Viking (D und D') detektierbar, am Mitteldarm sind Reste von Perlecan zu detektieren (Pfeil C'), während von Viking kein Signal zu sehen ist (Pfeil D'). Embryo in D und D' in dorsaler Ansicht. Abkürzungen: fg: Vorderdarm (*forgut*), hg: Enddarm (*hindgut*), mg: Mitteldarm (*midgut*), fb: Fettkörper (*fat body*). Messbalken = 100 µm.

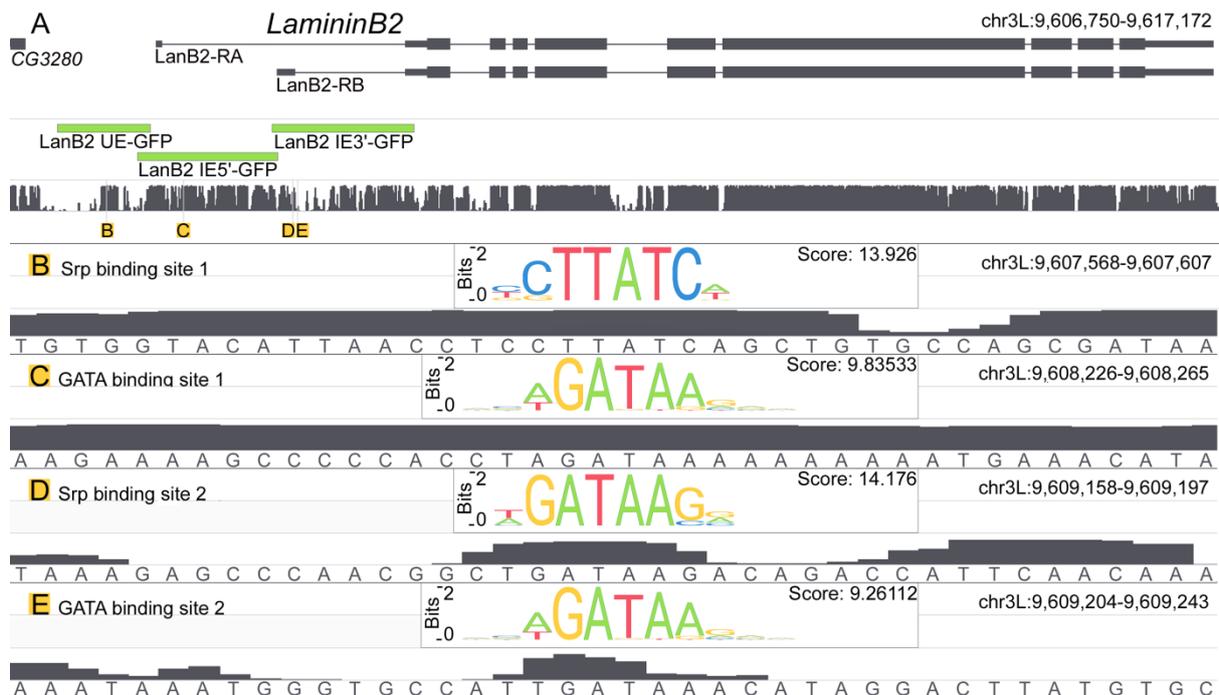


5.1.3. *In silico* Vorhersage von potentiellen Serpent-Bindestellen in *Laminin B1* und *Laminin B2*

Um potentielle Regulatoren für die Expression von *LanB1* und *LanB2* zu finden, wurden Datenbanken mit Profilen für Transkriptionsfaktor Bindestellen (TFBS, *transcription factor binding site*) genutzt. In der Annahme, dass Bindestellen, die für die *Laminin* Regulation essentiell sind, über die Insekten-Phylogenie hoch konserviert sind, wurden Treffer aus nicht codierenden Bereichen mithilfe von Konservierungswerten separiert, um falsch positive Treffer zu minimieren. Dabei wurde eine überrepräsentative Anhäufung von Srp- und einer zusätzlichen GATA-Bindestelle in den IE von *LanB1* und *LanB2* sowie einem zusätzlichen Treffer im UE von *LanB2* identifiziert. Diese Bindestellen zeigen sehr hohe Konservierungswerte und sind zum Teil in Regionen gelegen, die weitläufig konserviert sind, aber auch in Regionen, in denen lediglich die TFBS einen Ausschlag zeigt (Abb. 9 und 10).



**Abbildung 9: Genomischer Locus von *Laminin B1* mit Reportergenkonstrukten und vorhergesagten TFBSs.** (A) Schematische Repräsentation von *LanB1* Transkripten, den abgeleiteten Reportergenkonstrukten (grün), Konservierungswerte (grau) und Lage der vorhergesagten TFBSs (gelb hinterlegt). (B-H) Vorhergesagte TFBSs der jeweiligen GATA oder Srp Bindestellen mit den Anreicherungswerten (Kästen), Konservierungswerte (grau) und zugehörige DNA Sequenz.



**Abbildung 10: Genomischer Locus von *Laminin B2* mit Reportergergenkonstrukten und vorhergesagten TFBSs.** (A) Schematische Repräsentation von *LanB2* Transkripten, den abgeleiteten Reportergergenkonstrukten (grün), Konservierungswerte (grau) und Lage der vorhergesagten TFBSs (gelb hinterlegt). (B-E) Vorhergesagte TFBSs der jeweiligen GATA- oder Srp-Bindestellen mit den Anreicherungswerten (Kästen), Konservierungswerte (grau) und zugehörige DNA Sequenz.

#### 5.1.4. *Laminin B1* und *Laminin B2* Reportergergen-Expression in *serpent* mutanten Hintergrund und gewebespezifischer *serpent* Knockdown

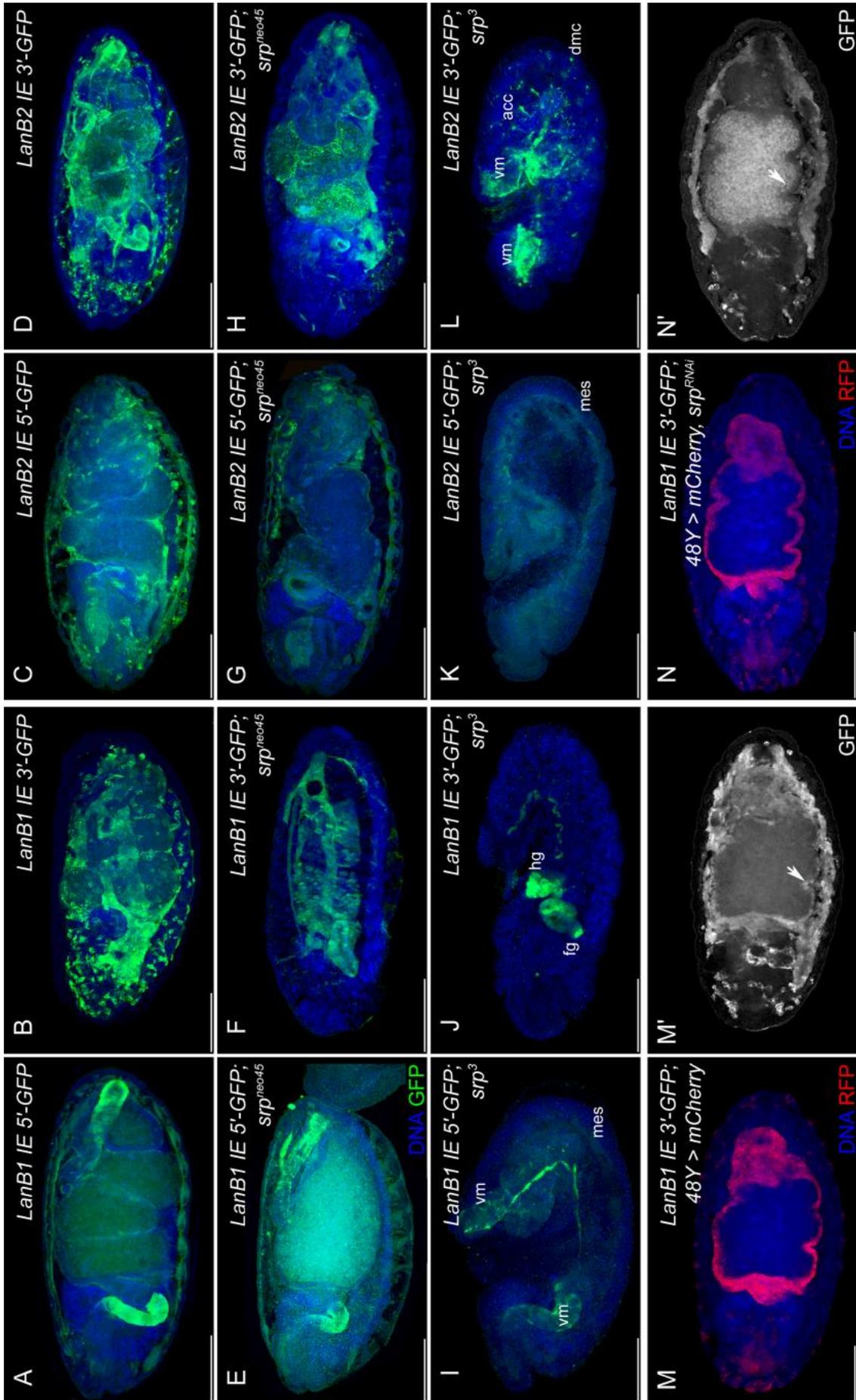
Im Zuge der Anhäufung von GATA-Bindestellen in den IE von *LanB1* und *LanB2* (Abb. 9 und 10) wurde die entsprechende Reportergergen-Expression im mutanten Hintergrund analysiert und die Auswirkung von verschiedenen Mutationen des GATA Faktors Srp auf die *LanB1* und *LanB2* Expression überprüft. Hierzu wurde wieder das hypomorphe Allel *srp<sup>neo45</sup>*, welches nur die Differenzierung der Hämocyten beeinflusst, und *srp<sup>3</sup>* als amorphes Allel genutzt (Nelson and Szauter, 1992; Reuter, 1994).

Die Reportergergen-Expression in Hämocyten in *srp<sup>neo45</sup>* Mutanten ließ sich für keine Laminin Konstrukte detektieren, obwohl die Expression in allen anderen Geweben vorhanden war (Abb. 11E-H). In *srp<sup>3</sup>* Embryonen sind der Fettkörper, die Amnioserosa und der Dotter undifferenziert. Zudem fehlen die Anlagen für die Hämocyten und die entodermalen Mitteldarmprimordien (Abel et al., 1993; Frank and Rushlow, 1996; Rehorn et al., 1996; Reuter, 1994). Die verbliebene Reportergergen-Expression war auf Vorläuferzellen der somatischen und viszeralen Muskulatur (Abb. 11I, K, L), einigen Zellen des PNS (wahrscheinlich Nebenzellen, *accessory cells*) (Abb. 11L) und den verlängerten ektodermalen Darmprimordien begrenzt (Abb. 11J).

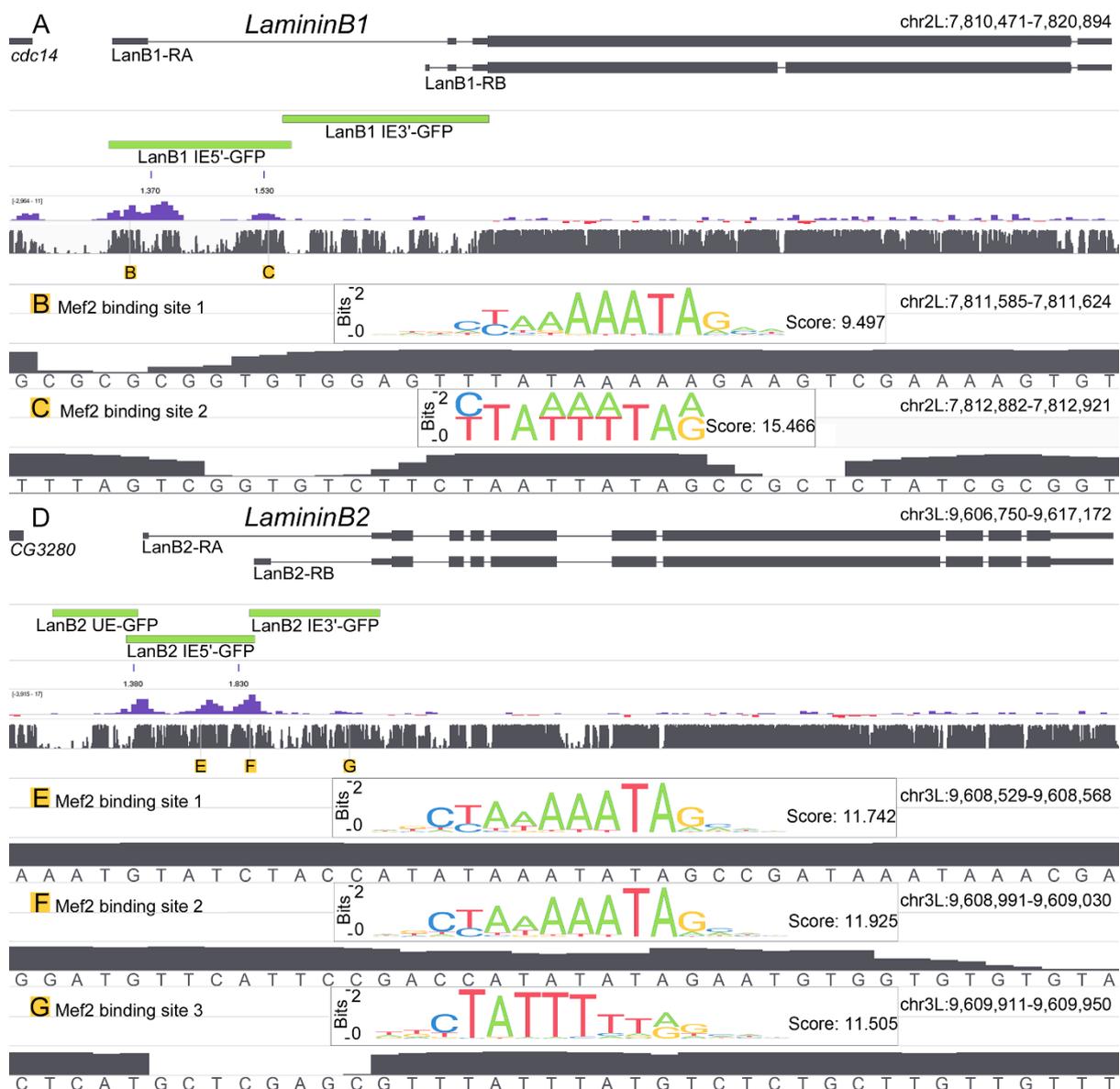
Der GATA Faktor Srp ist essentiell für die Determinierung von verschiedenen Geweben. Über diese Prozesse hinaus wird Srp kontinuierlich weiter exprimiert und ist entscheidend für die anhaltende Expression von Zielgenen wie *Alcohol dehydrogenase* (Abel et al., 1993). Um die potentielle regulative Rolle von Srp für die *LanB1* und *LanB2* Expression zu prüfen, wurde *RNA interference (RNAi)* in den entodermalen Mitteldarmprimordien nach deren Determinierung induziert. Hierfür wurde *srp<sup>RNAi</sup>* mit dem Treiberkonstrukt *48y-GAL4* im genetischen Hintergrund von *LanB1 IE 3'-GFP* getrieben.

Wildtypische Embryonen des Stadiums 16 zeigten starke Reporter-gen-Expression in entodermalen Zellen (Abb. 11M', Pfeil). Mit zusätzlicher *srp<sup>RNAi</sup>* Expression konnte keine Reporter-gen-Expression in den entsprechenden Mitteldarmzellen detektiert werden (Abb. 11N', Pfeil), während die umliegenden Hämözyten und der Fettkörper nicht betroffen waren und scheinbar wildtypische Intensität der Reporter-gen-Expression aufzeigten (Abb. 11N'). Dieses Experiment zeigte eine regulative Rolle von Srp für die Laminin-Expression in den entodermalen Mitteldarmprimordien.

**Abbildung 11 (nachfolgende Seite): Reporter-gen-Expression in *serpent* Mutanten und *serpent* Knockdown in Mitteldarmprimordien.** Reporter-gen-Expression von *LanB1* und *LanB2* intronischer Enhancer Region (A-D) im genetischen Hintergrund von hypomorphen *srp<sup>neo45</sup>* (E-H) und amorphen *srp<sup>3</sup>* (I-L) *srp* Allelen. (M) Wildtypische Embryonen mit *48y-GAL4* getriebenen *UAS-mCherry* Signal (rot), DNA (blau) und (M') *LanB1* IE 3'-GFP Reporter-gen-Expression (weiß). (N, N') *UAS-srp<sup>RNAi</sup>* führt zum Verlust der Reporter-gen-Expression in den Mitteldarmprimordien (Pfeil, N'), während die umliegenden Hämözyten und der Fettkörper nicht betroffen sind. Abkürzungen: acc: Nebenzellen (*accessory cells*), dmc: dorsale Mittelzellen (dorsal median cells), fg: Vorderdarm (*foregut*), hg: Enddarm (hindgut), mes: Mesoderm vm: viszerale Muskulatur. Messbalken = 100 µm.



Die verbliebene Reporter-Expression in *srp* mutanten Embryonen zeigte eine zusätzliche, *srp* unabhängige Laminin-Regulation durch andere Transkriptionsfaktoren. Aufgrund des gut untersuchten transkriptionellen Netzwerkes des *Drosophila* Mesoderms konnten ChIP-chip Daten genutzt werden, die durch Zinzen und Mitarbeitern erzeugt wurden (Zinzen et al., 2009), um die genomische Region von *LanB1* und *LanB2* nach *cis*-regulatorische Aktivität in 6-8 Stunden alten Embryonen zu analysieren (Abb. 12). Interessanterweise bindet der Transkriptionsfaktor Myocyte enhancer factor 2 (Mef2) in beiden 5' Regionen der intronischen Enhancer von *LanB1* und *LanB2*. Diese Konstrukte zeigten Reporter-Expression in frühen mesodermalen Zellen, was eine Rolle von Mef2 für die Regulation von *LanB1* und *LanB2* in mesodermalen Zellen, die zu Muskeln differenzieren, suggeriert.



**Abbildung 12: Myocyte enhancer factor 2 bindet im 5' Bereich der IE von *Laminin B1* und *Laminin B2*.** (A) Schematische Repräsentation der *LanB1* Transkripte, der abgeleiteten Reporter-Genkonstrukte (grün) und Mef2 Bindestellen aus ChIP-chip Daten und Bindeaffinität aus Chip-seq Daten von 6-8 Stunden alten Embryonen (lila) (Bonn et al., 2012; Zinzen et al., 2009). (B, C) Vorhergesagte TFBSs von Mef2 in *LanB1* ((Boyle et al., 2014) ; ID: M4675\_1.02). (D) Schematische Repräsentation der *LanB2* Transkripte, der abgeleiteten Reporter-Genkonstrukte (grün) und Mef2 Bindestellen aus chip-chip

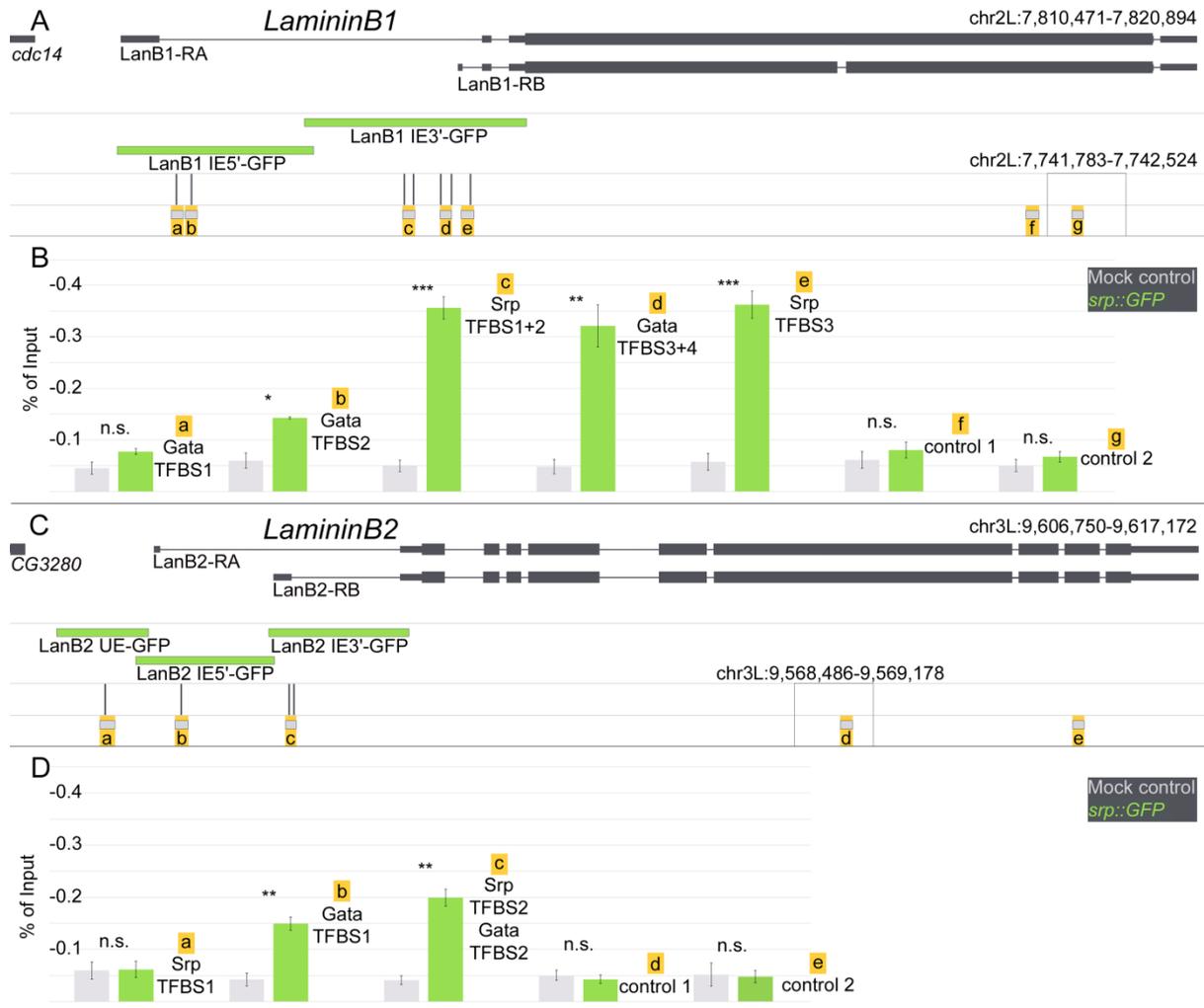
Daten und Bindeaffinität aus Chip-seq Daten von 6-8 Stunden alten Embryonen (lila) (Bonn et al., 2012; Zinzen et al., 2009). **(E, F, G)** Vorhergesagte TFBSs von Mef2 in *LanB2* ((Boyle et al., 2014) ; ID: M4675\_1.02)

#### 5.1.5. Serpent bindet direkt in den intronischen Enhancern von *Laminin B1* und *Laminin B2*

Die vorangegangenen Experimente zeigten eine regulative Rolle von Srp für *LanB1* und *LanB2*. Um eine direkte Bindung von Srp zu untersuchen, wurde eine ChIP mit anschließender qPCR durchgeführt.

Für *LanB1* wurde eine Anreicherung von Srp an fünf genomischen Loci, hervorgehend aus den sieben vorhergesagten GATA- respektive Srp-Bindestellen (Abb. 9B-H), analysiert. In der Region, die durch das *LanB1 IE 5'* Konstrukt repräsentiert wird, wurden zwei GATA-TFBS geprüft (GATA-TFBS 1 und GATA-TFBS 2). Die Ergebnisse zeigen eine geringe Anreicherung von Srp im Vergleich zu der Negativkontrolle (Abb. 13B, a und b), wohingegen die Anreicherung von Srp im Locus, der durch *LanB1 3'* wiedergespiegelt wird, deutlich höher als in der Negativkontrolle war (Abb. 13B, c-e). Die Kontroll-Primer belegen, dass die ChIP-DNA zwar mit einer schwachen Varianz amplifiziert wurde, es aber nicht zu signifikanten Anreicherungen kam (Abb. 13B, f und g). Die Bindung an die GATA-TFBS 2, welche im *LanB1 IE 5'* Bereich liegt, zeigt demnach eine schwache Anreicherung, während die Bindestellen, welche durch den *LanB1 IE 3'* Bereich repräsentiert werden, eine sehr starke Anreicherung aufzeigen.

Die Genregulation von *LanB2* wurde an drei genomischen Loci analysiert, die vier potentielle GATA- und Srp-Bindestellen beinhalten. Die erste Srp Bindestelle ist im UE (Srp-TFBS 1), eine ist in der 5' Region des IE (GATA-TFBS 1) und zwei in der 3' Region des IE lokalisiert (Srp-TFBS 2 and GATA-TFBS 2; Fig. 12C). Die Ergebnisse zeigten keine Anreicherung im UE (Abb. 13D, a), während beide Loci im IE starke Srp Anreicherung zeigten (Abb. 13 D, b und c).



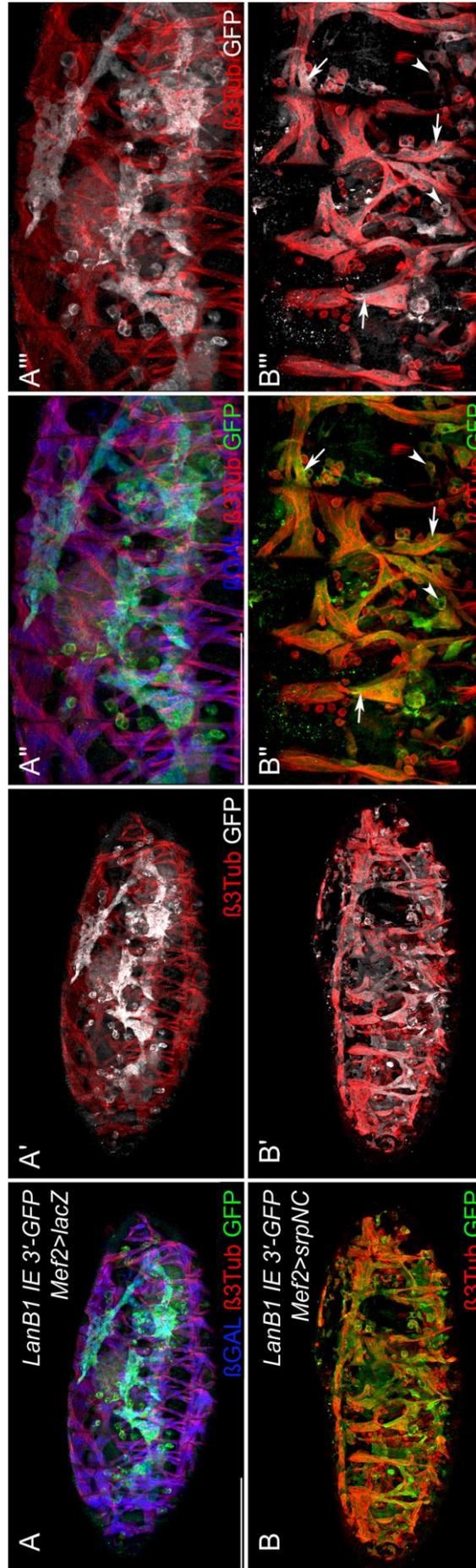
**Abbildung 13: ChIP-qPCR deckt Serpent Bindestellen in CRM von *Laminin B1* und *Laminin B2* auf.** (A, C) Schematische Darstellung der (A) *LanB1* und (C) *LanB2* Transkripte, der abgeleiteten Reportergenkonstrukte (grün) und vorhergesagten GATA/Srp Bindestellen mit der amplifizierten Region (hellgrau, Kleinbuchstaben). Kästen zeigen zusätzlich amplifizierte Regionen. (B, D) qPCR amplifizierte DNA aus ChIP Experimenten mit *srp::GFP* (grün) und Negativkontrollen (*white<sup>1118</sup>*, grau) Genotypen dargestellt als Prozent des Inputs. (B) Gata-TFBS 1: Kontrolle = 0,05 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,08 % ± 0,01 %; Gata-TFBS 2: Kontrolle = 0,06 % ± 0,02 %; *srp::GFP* = 0,14 % ± 0,02 %; Srp-TFBS 1+2: Kontrolle = 0,05 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,36 % ± 0,02 %; Gata-TFBS 3+4: Kontrolle = 0,05 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,32 % ± 0,04 %; Srp-TFBS 3: Kontrolle = 0,06 % ± 0,02 %; *srp::GFP* = 0,36 % ± 0,03 %; Kontrollregion 1: Kontrolle = 0,06 % ± 0,02 %; *srp::GFP* = 0,08 % ± 0,02 %; Kontrollregion 2: Kontrolle = 0,05 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,07 % ± 0,01 %. (D) Srp-TFBS 1: Kontrolle = 0,06 % ± 0,02 %; *srp::GFP* = 0,06 % ± 0,02 % Gata-TFBS 1: Kontrolle = 0,04 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,15 % ± 0,01 %; Srp-TFBS 2 + Gata-TFBS 2: Kontrolle = 0,04 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,23 % ± 0,02 %; Kontrollregion 1: Kontrolle = 0,05 % ± 0,01 %; *srp::GFP* = 0,04 % ± 0,01 %; Kontrollregion 2: Kontrolle = 0,05 % ± 0,02 %; *srp::GFP* = 0,05 % ± 0,01 %. T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\* p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p ≤ 0,005, nicht signifikant (n. s.) = p > 0,05. Mittelwerte ± SE. n = 3.

### 5.1.6. Ektopische Serpent Expression aktiviert *Laminin* Genexpression

Die *cis*-regulatorischen Fähigkeiten von Srp für die Induktion von *LanB1* und *LanB2* wurde durch ektopische Srp Expression in allen Muskelzellen mit dem *Mef2-GAL4* Treiber im Hintergrund von *LanB1 IE 3'* (Abb. 14) und *LanB2 IE 3'* (Abb. A4) überprüft.

Diese Reporterengenkonstrukte zeigten keine Expression in Muskelzellen (Abb. 5J für *LanB1 IE 3'* und Abb. 6J für *LanB2 IE3'*). Am Ende der Embryonalentwicklung bildet die somatische Muskulatur ein stereotypes Muster von fusionierten Muskelzellen. Diese mehrkernigen Zellen sind in wildtypischen Tieren durch anhaltende *Mef2* Expression (Abb. 14A und A'') und eine unverkennbare Zellmorphologie (Abb. 14A-A''') charakterisiert. Die *LanB1 IE 3'-GFP* Reporter-gen-Expression war in Kontrolltieren auf den Fettkörper, Mitteldarmzellen und Hämocyten beschränkt, wohingegen ektopisch exprimiertes Srp die Reporter-gen-aktivität in verschiedenen Muskeln (Abb. 14B'' und B''', Pfeile) und in unfusionierten Myoblasten aktivierte (Abb. 14B'' und 14B''', Pfeilköpfe) und somit eine ektopisch Aktivierung von *LanB1 IE 3'* CRMs widerspiegelte. Das äquivalente Experiment mit dem *LanB2 IE 3'-GFP* Reporter-gen-Konstrukt zeigte ähnliche Ergebnisse (Abb. A4)

**Abbildung 14 (nachfolgende Seite): Myogene Serpent Expression führt zur ektopischen Laminin Reporter-gen-Aktivierung und gestörter Myogenese. (A-A''')** Kontrolltiere zeigen GFP Reporter-gen-Expression von *LanB1 IE 3'-GFP* (A, A'' in grün, A', A''' in weiß) und *Mef2-GAL4* getriebene *UAS-lacZ* Aktivität (A, A'' in blau) mit anti- $\beta$ 3Tubulin als Muskelmarker (rot). **(B-B''')** Ektopische Expression von *UAS-srpNC* mit *Mef2-GAL4* reicht aus, um Laminin Reporter-gen-Expression in somatischen Muskeln (Pfeile) und unfusionierten Myoblasten (Pfeilköpfe) zu aktivieren und führt zu einer gestörten Myogenese. GFP Reporter-gen-Expression (B, B'' grün; B', B''' weiß) und anti- $\beta$ 3Tubulin (rot). Messbalken = 100  $\mu$ m.



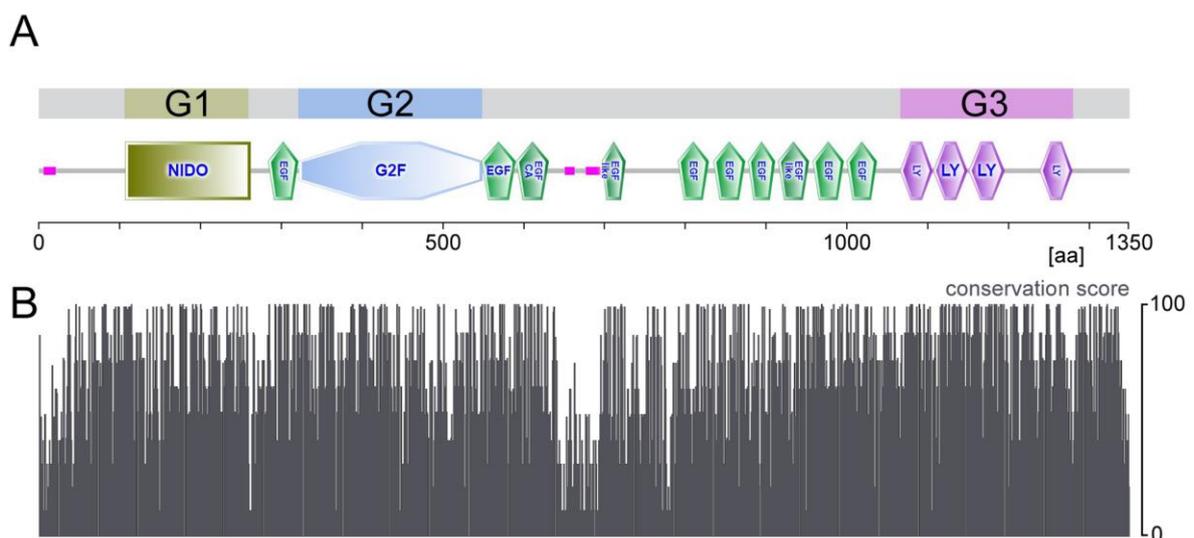
## 5.2. Nidogen beeinflusst die Fertilität

Inhalte dieses Kapitels wurden in der folgenden Originalpublikation veröffentlicht: Wolfstetter, G., Dahlitz, I., Pfeifer, K., Töpfer, U., Alt, J.A., Pfeifer, D.C., Lakes-Harlan, R., Baumgartner, S., Palmer, R.H., and Holz, A. (2019). Characterization of *Drosophila Nidogen/entactin* reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning. *Development* 146, dev168948.

### 5.2.1. Nidogen ist hoch konserviert

Nidogen wird dem so genannten „*basement membrane toolkit*“ zugerechnet. Für diese ECM Proteinen wurde eine essentielle Rolle bei der Assemblierung von Basallaminae (BI) postuliert, die sich in einer hohen Konservierung über das gesamte Tierreich äußern soll (Hynes, 2009, 2012).

Der Vergleich der *Drosophila melanogaster* Ndg Aminosäuresequenz mit den Sequenzen von 52 Orthologen, die diverse Taxa und die zwei humanen Orthologe miteinschließt (Tab. A1), zeigt die hohe Konservierung dieses Proteins. Dabei zeigen im Besonderen die Regionen der drei globulären und der *rod-like* Domäne durchschnittlich hohe Konservierungswerte (Abb15B). Lediglich die Region, die nach Domänenanalyse als Regionen mit geringer Komplexität (Abb. 15A, kleine pinkfarbene Kästen) ausgewertet wurden, zeigen eher schwache Werte in Bezug auf die Konservierung (Bereich der Aminosäuresequenz: 6-21 und 651-695). Der Erhalt dieser Proteinstruktur deutet auf eine für die Entwicklung entscheidende Rolle von *Ndg* hin.

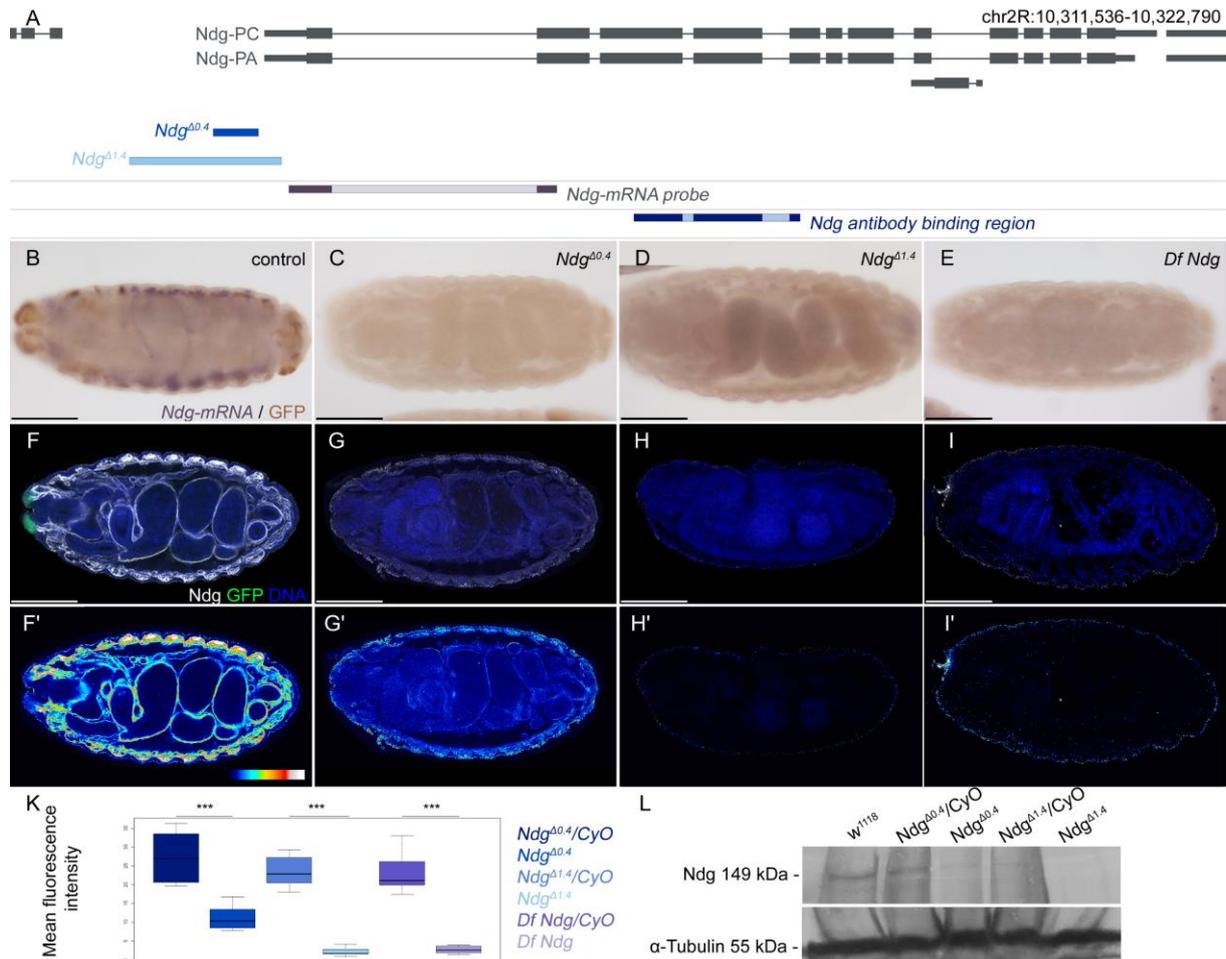


**Abbildung 15: Proteinstruktur von Nidogen und Konservierung der Domänen. (A)** Darstellung der Proteindomänen. Region mit geringer Komplexität (kleine pinkfarbene Kästen), erste globuläre Domäne (NIDO, olivgrün), zweite globuläre Domäne (G2F, blau), *Epidermal growth factor-like*- und *Calcium-binding EGF-like*-Domänen (grün), die hauptsächlich zwischen der zweiten und dritten globulären Domäne zu finden sind und eine *rod-like* Domäne bilden. Während die dritte globuläre Domäne (pink) aus vier *low-density lipoprotein receptor* (LDLR) ähnlichen Domänen besteht. **(B)** Konservierungswerte der Ndg Aminosäuresequenz von *Drosophila melanogaster* verglichen mit 52 orthologen Sequenzen (Tab. A1).

### 5.2.2. Expression von *Nidogen*

In *Drosophila melanogaster* codiert lediglich ein Gen für Nidogen, welches in zwei Isoformen exprimiert wird, die sich nur in der 3' UTR unterscheiden (Abb. 16A). Die *in situ* Hybridisierung der mRNA zeigt somit die komplette Expression. Um die Proteinverteilung von Ndg zu verfolgen, wurde ein Ndg-spezifischer Antikörper verwendet (Wolfstetter et al., 2009).

Die Expression von *Ndg*-mRNA ist am Ende der Embryonalentwicklung stark in der viszeralen und der somatischen Muskulatur sowie den Kappenzellen (*cap cells*) der Chordotonalorgane detektierbar (Abb. 16B). Die damit verglichene Proteinverteilung von *Ndg* erstreckt sich dagegen deutlich über alle embryonalen BI (Abb. 16F und F'). Für die weitere Analyse von *Ndg* während der Entwicklung wurde die verbleibende Expression von zwei *Ndg* Allelen (Wolfstetter et al., 2019) untersucht. Hierzu wurden die mRNA und Protein-Verteilung der Allele *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> und *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> mit Kontrollen (balancierten Geschwistertieren) und einem Stamm mit einer Defizienz im genomischen Locus von *Ndg* verglichen. Die Ergebnisse der vergleichenden *in situ* Hybridisierung zeigen keine detektierbare mRNA in den *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> und *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> Allelen sowie der Defizienz (Abb. 16C-E). Durch Antikörperfärbung lässt sich ein Rest Protein in dem hypomorphen Allel *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> detektieren (Abb. 16G und G'). Das durch konfokales Laserscanmikroskop aufgenommene mittlere Signal der Antikörperdetektion ergab bei *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> Tieren einen Mittelwert von  $11,08 \pm 3,06$ , während die balancierten Geschwistertiere einen Mittelwert von  $27,12 \pm 6,06$  aufzeigten (Abb. 16K). Die Antikörperfärbung brachte dabei sowohl ein spezifisches Signal hervor, welches unter anderem schwach die viszerale Muskulatur umgab, als auch ein unspezifisches Signal in der Region der Epidermis (Abb. 18G und G'). Die Analysen der *Ndg* Proteinverteilung in *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> wie auch in *Df Ndg* Embryonen zeigten lediglich ein unspezifisches Signal. Die Analysen der Fluoreszenzintensitäten ergaben für *Ndg*<sup>Δ1.4</sup>/*CyO*  $23,20 \pm 3,82$ ; für *Ndg*<sup>Δ1.4</sup>  $2,05 \pm 0,98$ , für *Df Ndg*/*CyO*  $22,75 \pm 4,65$  und für *Df Ndg*  $2,68 \pm 1$ . Die Reduktion der Proteinmenge in dem hypomorphen Allel und in der jeweils heterozygoten Situation beider Allele lässt sich auch durch Analysen mittels Western Blot verifizieren. Hierzu wurden dritte Larven von Kontrolltieren (*w*<sup>1118</sup>), balancierte und homozygote *Ndg* Mutanten analysiert. Während *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> kein Signal hervorbrachte, wurden im Ansatz von *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> eine schwache Bande, eine vergleichsweise etwas stärkere Bande in den heterozygoten Ansätzen und die stärkste Bande in den Kontrolltieren detektiert (Abb. 16L).



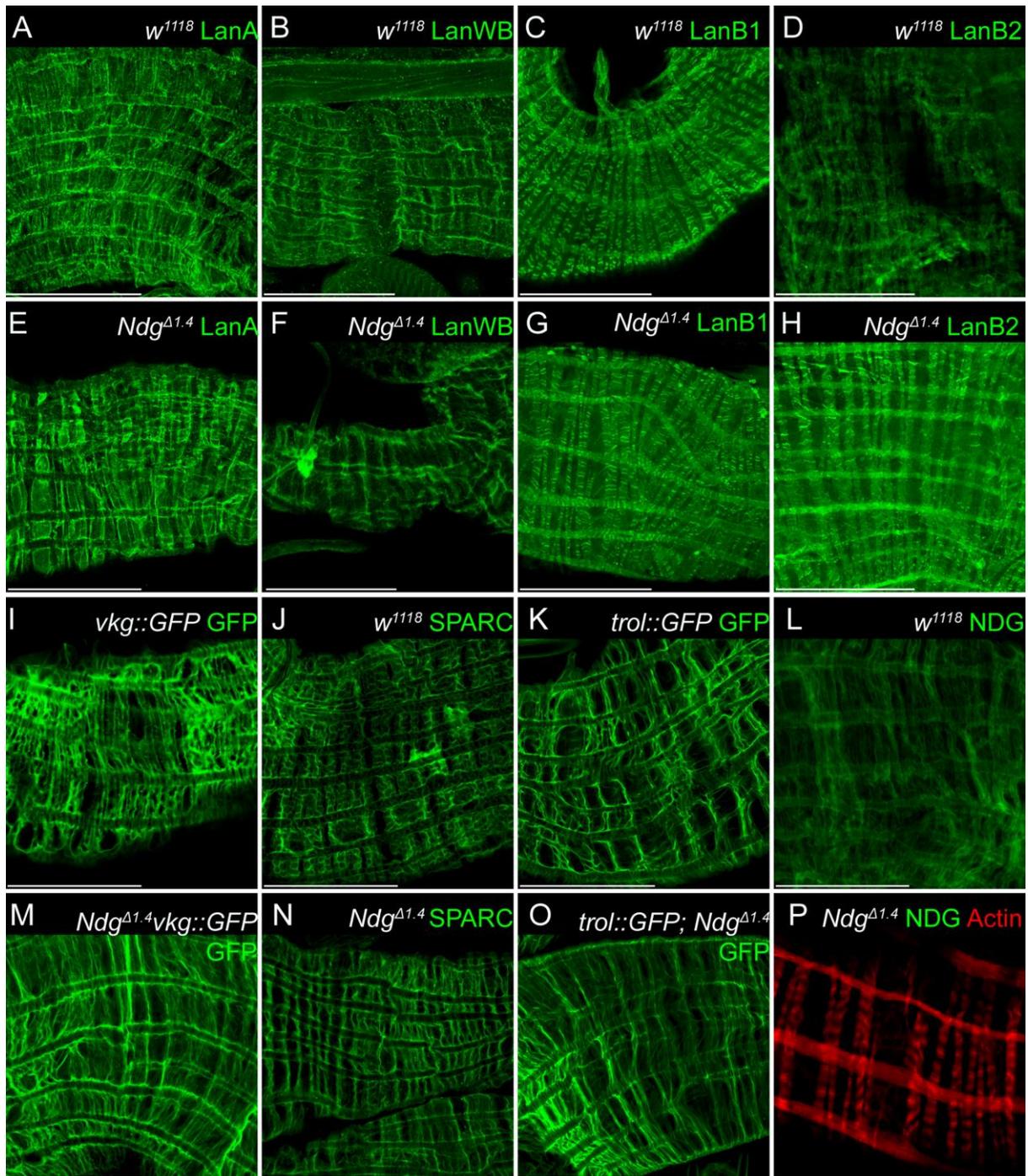
**Abbildung 16: Expressionsanalyse von *Nidogen* Allelen.** (A) Schematische Repräsentation der genomischen Region von *Ndg* mit den Deletionsbereichen der Allele *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> (dunkelblau) und *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> (hellblau), der Bereich der verwendeten *antisense* Sonde (weinrot) und dem Bereich, an dem der Antikörper bindet. (B-E) *In situ* Hybridisierung der *Ndg-mRNA* (lila) mit anti-GFP Antikörperfärbung (braun) und (F-I') anti-Nidogen Antikörperfärbung (F, G, H, I in weiß; F', G', H', I' in der Intensitätsskala royal) an balancierten Kontrolltieren (B, F, F'), *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> Embryonen (C, G, G'), *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> Embryonen (D, H, H') und *Df Ndg* Embryonen (E, I, I'). (K) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von anti-Ndg Antikörperfärbung an *Ndg*<sup>Δ0.4</sup>, *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> und *Df Ndg* Embryonen im Vergleich zu den parallel gefärbten balancierten Geschwistertieren. Mittlere Fluoreszenzintensität des gesamten gescannten Bereiches mit den Mittelwerten ± SD: *Ndg*<sup>Δ0.4</sup>/*CyO* = 27,12 ± 6,06; *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> = 11,08 ± 3,06; *Ndg*<sup>Δ1.4</sup>/*CyO* = 23,20 ± 3,82; *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> = 2,05 ± 0,98; *Df Ndg*/*CyO* = 22,75 ± 4,65; *Df Ndg* = 2,68 ± 1. T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\* p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p ≤ 0,005, nicht signifikant (n. s.) = p > 0,05. n = 10. (L) Western Blot mit enzymatischem Nachweis von anti-Ndg und anti-α-Tub Antikörperfärbung. Die Detektion von Ndg erfolgt auf einer Laufhöhe von 149 kDa und reflektiert die dosisabhängige Expressionslevel, die in Kontrolltieren (*w*<sup>1118</sup>) am stärksten, in *Ndg*<sup>Δ0.4</sup>/*CyO* stärker als in *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> homozygoten Tieren und in *Ndg*<sup>Δ1.4</sup>/*CyO* zu erkennen sind, während *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> Tiere keine Bande zeigen. Das Kontrollprotein αTub zeigt in allen Ansätzen starke Expression.

### 5.2.3. Komposition der Basallamina in *Nidogen* Mutanten

Um die zuvor postulierte Rolle von Nidogen für den Zusammenhalt der beiden Basallamina-Netzwerke zu prüfen, wurden immunhistochemische Analysen mit Antikörpern oder Exon-Trap Linien in Kontrollen und im amorphen *Ndg* mutanten Hintergrund miteinander verglichen.

Im Kontext der starken mesodermalen Expression und Proteinauflagerung von Ndg um die viszerale Muskulatur in wildtypischen Tieren wurden Kontrolltiere und *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> Larven im dritten Larvalstadium präpariert und immunhistochemisch gefärbt. Analysen zur Veränderung der Laminin-Schicht erfolgten mit Antikörpern spezifisch gegen die α-Untereinheiten Laminin A (LanA) und Laminin Wing blister (LanWb), gegen die β-Untereinheit Laminin B1 (LanB1) sowie gegen die γ-Untereinheit Laminin B2 (LanB2) und zusätzlich gegen Laminin Heterotrimere (Laminin KC cell). Analysen zur Veränderung der Kollagen-Schicht wurden mithilfe der Exon-Trap Linie *vkgs::GFP* untersucht, die eines der beiden Kollagen IV Proteine nachverfolgen lässt, einen spezifischen Antikörper gegen Kollagen IV und einen spezifischen Antikörper gegen das mit Kollagen interagierende SPARC/BM-40. Die Verteilung von Perlecan wurde ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper und mit einer Exon-Trap Linie *trol::GFP* untersucht. Zur Kontrolle wurde ein spezifischer Antikörper gegen Nidogen verwendet.

Die vergleichende Analyse von *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> Mutanten und Kontrolltieren zeigten keinerlei Veränderung in Hinblick auf die Komposition der analysierten Proteine (Abb.17). Die Intensität der jeweiligen zu vergleichenden Färbungen zeigte ebenfalls keine feststellbaren Unterschiede. Trotz der direkten Verbindungen, die Ndg mit dem Laminin- und dem Kollagen-Netzwerk eingeht, spielt es keine essentielle Rolle für die Formierung der Bl in der viszeralen Muskulatur von Larven.



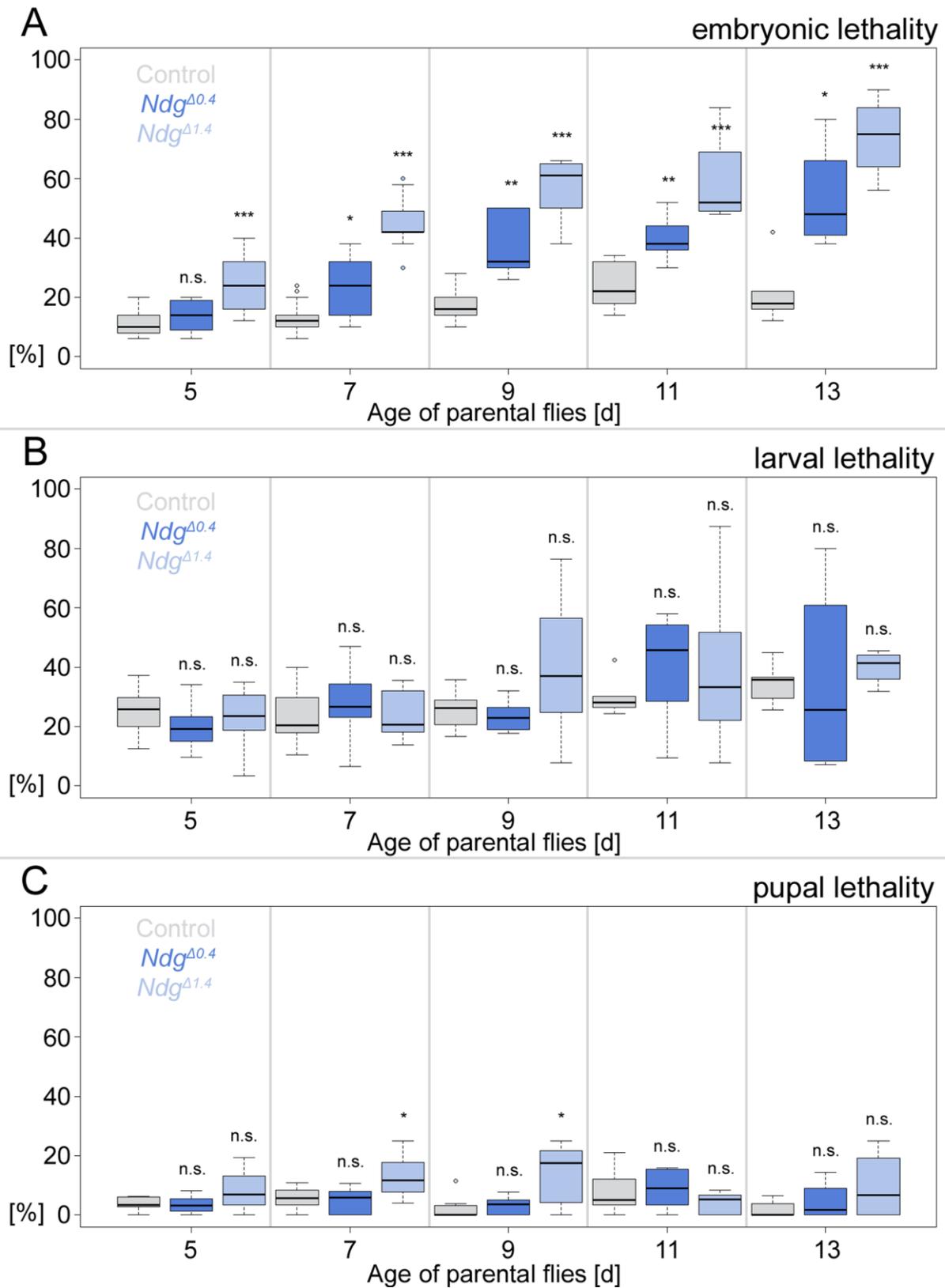
**Abbildung 17: ECM-Komposition der viszerale Muskulatur in *Nidogen* Mutanten.** (A-D, I-L) Kontrolltiere mit den Genotypen  $w^{1118}$  (A-D, J, L),  $vkg::GFP$  (I) und  $trol::GFP$  (K). (E-H, M-P) *Ndg* Mutanten mit den Genotypen  $Ndg^{\Delta 1.4}$  (B-H, N, P),  $Ndg^{\Delta 1.4}, vkg::GFP$  (M) und  $trol::GFP; Ndg^{\Delta 1.4}$  (O). Die Antikörperfärbungen mit anti-Laminin A (A und E), anti-Laminin Wb (B und F), anti-Laminin B1 (C und G), anti-Laminin B2 (D und H), anti-GFP (I, K, M, O) und anti-Sparc (J und N) zeigen keinen Unterschied im Hinblick auf die Komposition der BI zwischen Kontrollen und *Ndg* Mutanten. Die Proteinverteilung von *Ndg* um die viszerale Muskulatur in Kontrolltieren (L) ist in *Ndg* Mutanten nicht vorhanden (P). Färbung von F-Actin (rot) markiert die viszerale Muskulatur in *Ndg* Mutanten mit gemeinsamer Färbung von *Ndg* (P). Messbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 5.2.4. Vitalität von *Nidogen* Mutanten

Die Entwicklung der embryonalen Gewebe verläuft nach immunhistologischen Analysen in *Ndg* Mutanten wildtypisch (nicht gezeigt). Um den Verlust von *Ndg* weiter zu charakterisieren, wurden Letalitätstests in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila* durchgeführt. Dabei wurde die Sterblichkeitsrate von Kontrolltieren (*white<sup>1118</sup>*) mit den *Nidogen* Allelen *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* in Altersabhängigkeit der Elterntiere miteinander verglichen.

Die Analyse der embryonalen Letalität an Kontrolltieren zeigte einen leicht ansteigenden Wert mit steigendem Alter der Elterntiere, der nach Varianzanalyse signifikant ist (Abb. 18A; *One-Way Anova* = \*\*). Die Letalität der *Ndg* Allele stieg bei *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* leicht und zeigte signifikante Unterschiede zu den Kontrollen ab Tag 7 (Abb. 18A). Bei *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* sind die Werte aller beobachteten Zeitpunkte hoch signifikant (Abb. 18A). Der Faktor Alter der Elterntiere ist also ausschlaggebend für die steigende Letalität der *Ndg* mutanten Embryonen (*One-Way Anova* *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* = \*\*\*, *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* = \*\*\*) und zweifaktorielle Varianzanalysen zeigten darüber hinaus, dass neben der steigenden Letalität in Kontrolltieren mit dem Alter der Eltern auch der Genotyp über alle gemessenen Zeitpunkte hinweg einen signifikanten Unterschied ausmacht (*Two-Way Anova* *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* = \*, *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* = \*\*). Die Analysen der larvalen sowie pupalen Letalität zeigten in keinem Ansatz signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und *Ndg* Allelen, weder in Abhängigkeit des Faktors Alter der Elterntiere noch des Faktors Genotyp (*Anova larval*: *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* = n. s., *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* = n. s., *pupal*: *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* = n. s., *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* = n. s.) (Abb. 18B und C).

**Abbildung 18 (nachfolgende Seite): Letalität von *Nidogen* Mutanten zu verschiedenen Entwicklungszeiten. (A) Embryonale Letalität von Kontrolltieren (*w<sup>1118</sup>*) mit steigendem Alter der Elterntiere (Tag 5= 11 % ± 4,45 %, n = 10; Tag 7=13,23 % ± 5,57 %, n=13; Tag 9=17,33 % ± 5,48 %, n= 9; Tag 11= 23,67 % ± 8,24 %, n = 6; Tag 13= 22 % ± 11,75 %, n = 5), *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* (Tag5= 13,67 % ± 5,25 %, n = 12; Tag 7= 23,78 % ± 10,7 %, n = 9; Tag 9= 36,67 % ± 10,56 %, n = 6; Tag 11= 40 % ± 8,37 %, n = 5; Tag13= 53,5 % ± 18,57 %, n = 4) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (Tag 5= 24,46 % ± 8,84 %, n = 13; Tag 7= 45,27 % ± 8,59 %, n = 11; Tag 9= 57 % ± 10,2 %, n = 8; Tag 11= 60 ± 15 %,45, n = 7; Tag13= 74 % ± 14,14 %, n = 4). (B) Larvale Letalität von Kontrolltieren mit steigendem Alter der Elterntiere (*w<sup>1118</sup>*) (Tag 5= 25,27 % ± 6,89 %, n = 10; Tag 7= 23,55 % ± 9,2 %, n = 13; Tag 9=25,64 % ± 6,24 %, n = 9; Tag 11=29,97 % ± 6,45 %, n = 6; Tag13= 34,46 % ± 7,34 %, n = 5), *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* (Tag5= 19,63 % ± 7,17 %, n = 12; Tag 7= 27,45 % ± 11,71 %, n = 9; Tag 9= 23,46 % ± 5,54 %, n = 6; Tag 11= 39,18 % ± 20,15 %, n = 5; Tag13= 34,62 % ± 34,09 %, n = 4) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (Tag 5= 23,87 % ± 8,67 %, n = 13; Tag 7= 24,25 % ± 8,09 %, n = 11; Tag 9= 40,11 % ± 23,91 %, n = 8; Tag 11= 39,40 ± 26,86 %, n = 7; Tag 13= 40,03 % ± 5,91 %, n = 4). (C) Pupale Letalität von Kontrolltieren (*w<sup>1118</sup>*) mit steigendem Alter der Elterntiere (Tag 5= 3,98 % ± 2,13 %, n = 10; Tag 7= 5,63 % ± 3,5 %, n = 13; Tag 9=2,29 % ± 4,01 %, n = 9; Tag 11=6,93 % ± 8,22 %, n = 6; Tag13= 2,54 % ± 3,14 %, n = 5), *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* (Tag5= 3,11 % ± 2,56 %, n = 12; Tag 7= 5,54 % ± 4,18 %, n = 9; Tag 9= 3,21 % ± 3,31 %, n = 6; Tag 11= 7,08 % ± 6,91 %, n = 5; Tag 13= 5,95 % ± 7,43 %, n = 4) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (Tag 5= 8,67 % ± 5,98 %, n = 13; Tag 7= 13,15 % ± 8,35 %, n = 11; Tag 9= 13,53 % ± 10,8 %, n = 8; Tag 11= 4,5 ± 3,63 %, n = 7; Tag13= 12,78 % ± 12,51 %, n = 4). T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\* p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p ≤ 0,005, nicht signifikant (n. s.) = p > 0,05. Mittelwerte ± SD.**

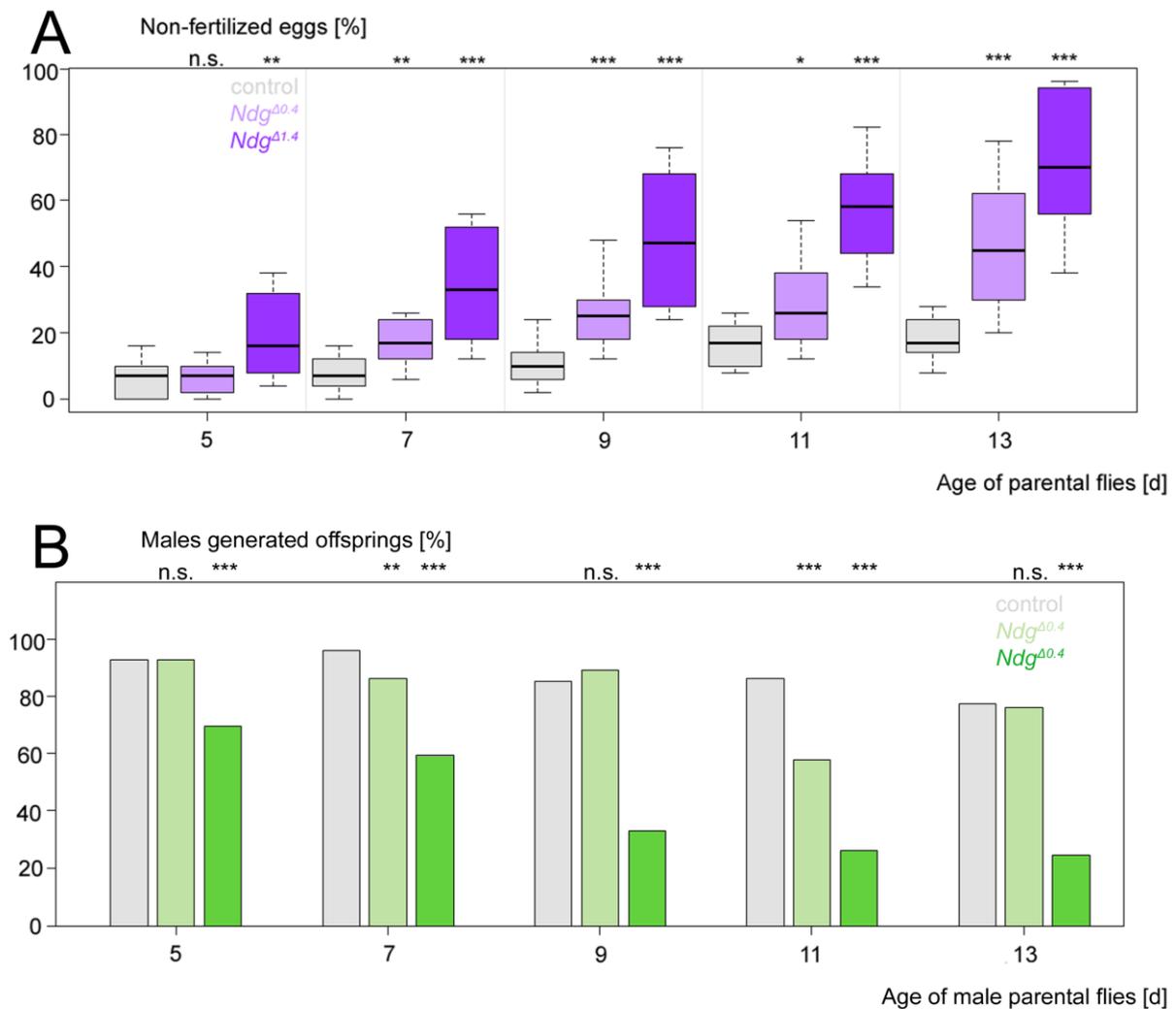


### 5.2.5. *Nidogen* Mutanten zeigen verminderte Fertilität

In *Ndg* Mutanten konnten keine morphologischen Defekte während der Embryonalentwicklung identifiziert werden. Da in den Letalitätsanalysen eine hoch signifikante Anzahl an Embryonen der *Ndg* Mutanten nicht schlüpfte, wurde die Anzahl der von *Ndg* mutanten Weibchen gelegten unbefruchteten Eier quantifiziert und die Fertilität der Männchen getestet.

Die Anzahl der unbefruchteten Eier in den Kontrollansätzen stieg signifikant in Abhängigkeit vom Alter der Elterntiere (Abb. 19A in grau, *One-Way* Anova = \*\*\*). Im Vergleich mit den Kontrollwerten konnte in *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> Ansätzen ab Tag 7 jeweils ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 19A in hellviolett, *One-Way* Anova = \*\*\*). Die Analyse der *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> Ansätze zeigte durchgängige hoch signifikante Unterschiede zu den Kontrollwerten (Abb. 19A in dunkelviolett, *One-Way* Anova = \*\*\*). Die ermittelten Daten der nicht befruchteten Eier gleichen dabei den Daten der nicht geschlüpften Eier aus dem Letalitätstest (Vergleich Abb. 18A mit Abb. 19A). Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigen neben dem in allen Ansätzen steigenden Wert durch den Faktor Alter der Elterntiere eine zusätzliche Abhängigkeit des Genotyps (*Two-Way* Anova *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> = \*, *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> = \*\*).

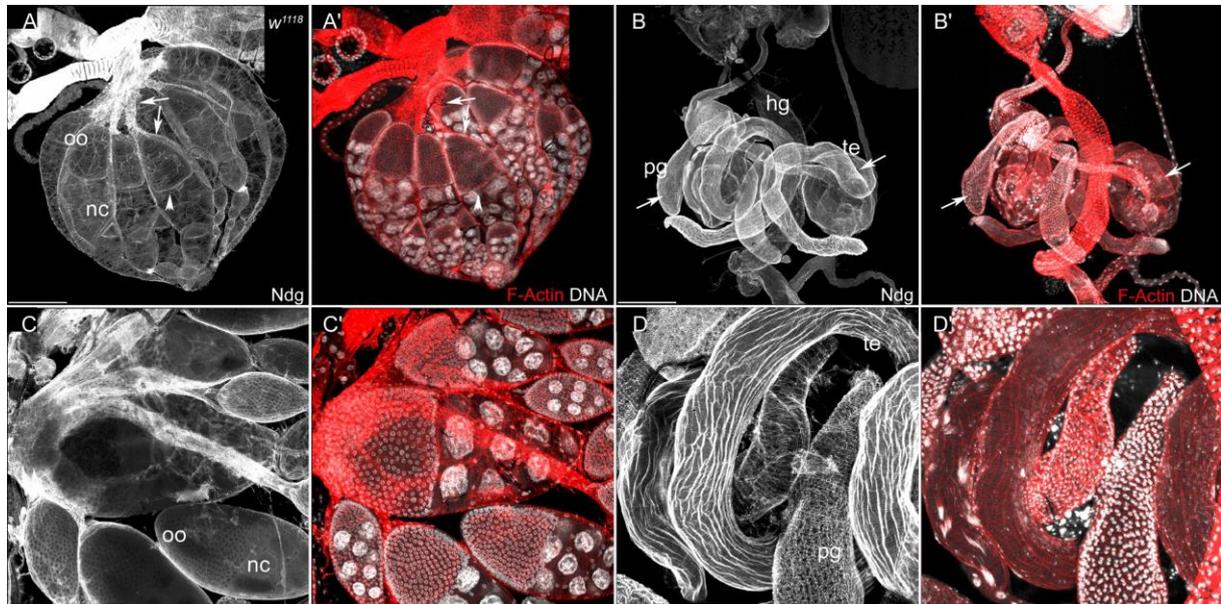
Die prozentuale Anzahl der *Ndg* mutanten Männchen, die Nachkommen hervorbrachten, resultierte im Ansatz von *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> in widersprüchlichen Ergebnissen, die nur teilweise signifikant sind und auf keinen Einfluss des Faktors Alter der Männchen hindeuten (Abb. 19B hellgrün). Im Gegensatz dazu konnte im Ansatz *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> ein durchgängig hoch signifikanter Unterschied zu den Kontrollansätzen festgestellt werden, der eine starke Altersabhängigkeit zeigte (Abb. 19B dunkelgrün). Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollwerten und den Werten von *Ndg*<sup>Δ0.4</sup> (*Two-Way* Anova = n. s.) und hoch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollwerten und *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> (*Two-Way* Anova = \*\*\*).



**Abbildung 19: Fertilitätstest an *Nidogen* Mutanten. (A)** Unbefruchtete Eier von weiblichen Kontrolltieren ( $w^{1118}$ , grau) sowie  $Ndg^{\Delta 0.4}$  (hellviolett) und  $Ndg^{\Delta 1.4}$  (dunkelviolett) Mutanten, die mit männlichen Kontrolltieren ( $w^{1118}$ ) verpaart wurden. Unbefruchtete Eier von Kontrolltieren (Tag 5 = 6,4 %  $\pm$  5,48 %, Tag 7 = 7,6 %  $\pm$  5,14 %, Tag 9 = 10,6  $\pm$  6,18 %, Tag 11 = 16,6 %  $\pm$  6,18 %, Tag 13 = 18,2 %  $\pm$  7,08 %),  $Ndg^{\Delta 0.4}$  (Tag 5 = 6, %  $\pm$  4,81 %, Tag 7 = 16,6 %  $\pm$  6,8 %, Tag 9 = 25,2  $\pm$  10,29 %, Tag 11 = 28,2 %  $\pm$  13,15 %, Tag 13 = 46,2 %  $\pm$  19,81 %) und  $Ndg^{\Delta 1.4}$  (Tag 5 = 19,2 %  $\pm$  12,04 %, Tag 7 = 33,4 %  $\pm$  16,6 %, Tag 9 = 49,2  $\pm$  20,64 %, Tag 11 = 58,6 %  $\pm$  15,38 %, Tag 13 = 71,4 %  $\pm$  20,89 %). T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p \leq 0,005$ , nicht signifikant (n. s.) =  $p > 0,05$ .  $n = 10$ , Anzahl der Mittelwerte aus je 50 ausgezählten Eiern. **(B)** Männchen die Nachkommen hervorbrachten. Kontrolltiere ( $w^{1118}$ , grau),  $Ndg^{\Delta 0.4}$  (hellgrün) und  $Ndg^{\Delta 1.4}$  (dunkelgrün) Mutanten. Kontrolltiere (Tag 5 = 93 %,  $n = 30$ , Tag 7 = 97 %,  $n = 30$ , Tag 9 = 86 %,  $n = 28$ , Tag 11 = 87 %,  $n = 30$ , Tag 13 = 78 %,  $n = 27$ ),  $Ndg^{\Delta 0.4}$  (Tag 5 = 93 %,  $n = 30$ , Tag 7 = 87 %,  $n = 30$ , Tag 9 = 90 %,  $n = 29$ , Tag 11 = 58 %,  $n = 12$ , Tag 13 = 76 %,  $n = 17$ ) und für  $Ndg^{\Delta 1.4}$  (Tag 5 = 70 %,  $n = 30$ , Tag 7 = 60 %,  $n = 30$ , Tag 9 = 33 %,  $n = 24$ , Tag 11 = 27 %,  $n = 15$ , Tag 13 = 25 %,  $n = 12$ ). Chi-Quadrat-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p \leq 0,005$ , nicht signifikant (n. s.) =  $p > 0,05$ .  $n =$  Anzahl der Ansätze pro getesteten Tag.

Um die Rolle von *Ndg* für die Fertilität von Weibchen und Männchen zu untersuchen, wurde zunächst die Proteinverteilung im Ovar und in Testes analysiert.

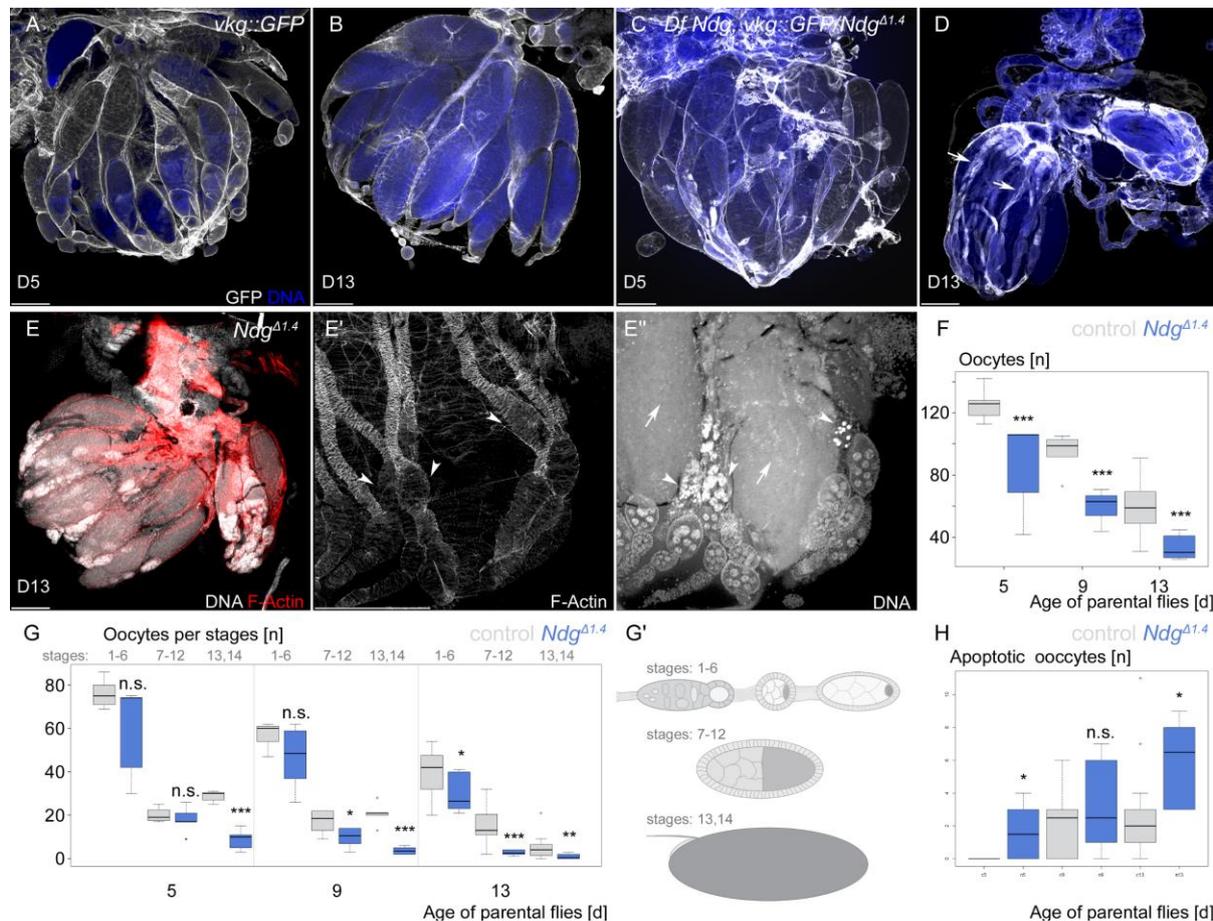
*Ndg* umgibt im Ovar die netzartig aufgebaute Muskelschicht, die das komplette Gewebe umhüllt, und die Muskelschicht, die auf dem Follikel­epithel und den Ovariolen liegt. Außerdem konnte *Ndg* auf der Basalseite der Follikel­epithel­zellen detektiert werden, welche die Oozyten umgeben (Abb. 20A und C, Pfeile). Die Testes sind komplett von Muskulatur umgeben, die alle eine *Ndg* positive BI besitzen (Abb. 20B und D, Pfeile).



**Abbildung 20: Nidogen Proteinverteilung in Ovarien und Testes.** (A, B, C, D) Proteinverteilung von *Ndg* mit anti-*Ndg* Antikörperfärbung an Ovar (A und C) und Testes (B und D). (A', B', C', D') F-Actin (rot) und DNA (weiß) Färbung an Ovar (A' und C') und Testes (B' und D') von jeweils neun Tage alten adulten Tieren. *Ndg* umgibt im Ovar die Muskulatur (Pfeil, A und A') wie auch die Oozyten (Pfeilkopf, A und A'). In den Testes umgibt *Ndg* stark die verschiedenen Muskulaturtypen, die den kompletten Testes umgeben (Pfeile in B und B'). Abkürzungen: oo: Oozyte, nc: Nährzelle (*nurse cells*), hg: Enddarm (*hindgut*), te: Testis, pg: Paragonium. Messbalken = 200  $\mu$ m.

*Ndg* Mutanten zeigten eine verminderte Fertilität (Abb. 19). Daher wurde die Morphologie des Ovars und der Testes von adulten Fliegen jeweils fünf und 13 Tage nach dem Schlüpfen untersucht und verglichen, da der altersabhängig steigende Verlust der Fertilität Phänotypen suggeriert. In der Analyse der Testes von *Ndg* Mutanten konnten keine Hinweise auf morphologische Defekte identifiziert werden (Abb. A5). Das Ovar von 13 Tage alten *Ndg* mutanten Weibchen zeigte hingegen Störungen. Während die Verteilung von Kollagen IV auch im Ovar von alten Mutanten zu detektieren war und keine strukturellen Auffälligkeiten zeigte (Abb. 21D), konnten morphologische Defekte detektiert werden. Die Ovarien von alten Mutanten waren oft kleiner als die der Kontrolltiere (Vergleich Abb. 21B mit D) und es konnten häufig leere Ovariolen beobachtet werden (Abb. 21D, Pfeil). Die daraus resultierende Quantifizierung der Gesamtzahl von Oozyten zwischen Kontrolltieren und *Ndg* Mutanten ergab hoch signifikante Unterschiede in allen Ansätzen (Abb. 21F). Eine genauere Analyse dieses Sachverhaltes durch die Einteilung der gezählten Oozyten in unterschiedliche Reifestadien (Abb. 21G') zeigte signifikante Unterschiede in den späten Stadien 13 und 14 (Abb. 21 G). In Ovarien von 13 Tage alten *Ndg* mutanten Weibchen konnten hyperkondensierte Kerne detektiert werden, die schon vor der wildtypischen Degradierung der Nährzellen (Cavaliere et al., 1998; King,

1970) abzusterben schienen (Abb. 21E'', Pfeilkopf). Dabei handelte es sich um Oozyten in den Stadien 7-12, welche sich in Ovariolen befanden, in denen keine älteren Stadien in derselben Ovariole detektiert werden konnten (Abb. 21E', Pfeile). Die dazugehörigen Oozyten wurden hier als apoptotisch interpretiert. Des Weiteren konnte in solchen Tieren bei gereiften Oozytenstadien eine Störung im Hinblick auf die Anordnung von Kernen der Follikelepithelzellen beobachtet werden (Abb. 21E'', Pfeil). Die Anzahl der als apoptotisch interpretierten Oozyten wurde quantifiziert und zeigt eine altersabhängig steigende Anzahl. Die Ergebnisse zeigen erhöhte Mittelwerte, die bei einem Alter der Elterntiere von fünf und 13 Tagen signifikant waren. (Abb. 21H).



**Abbildung 21: Kollagen Verteilung und Morphologie von *Nidogen* Mutanten im Ovar. (A-D)** Anti-GFP Antikörperfärbung (weiß) an Ovarien von fünf (A und C) und 13 (B und D) Tage alten Tieren. Tiere mit den Genotypen *vkg::GFP* (A und B), *Df Ndg, vkg::GFP/Ndg<sup>Δ1.4</sup>* (C und D) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* (E, E', E''). Färbung der DNA (A-D in blau, E-E'' in weiß) und von F-Actin (rot, E-E''). Messbalken = 200 µm (F) Anzahl an Oozyten aller Stadien von Kontrolltieren (*white<sup>1118</sup>*) (grau) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (blau) in Abhängigkeit des Alters der Elterntiere. Kontrolle (Tag 5= 124,86 ± 9,49 n= 7; Tag 9 = 95,17 ± 11,8 n = 6; Tag 13 = 60,42 ± 17,74 n = 12) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (Tag 5= 85,5 ± 29,26 n = 5; Tag 9 = 60,33 ± 9,87 n = 6; Tag 13 = 33,33 ± 8,12 n = 6). (G) Anzahl von Oozyten verschiedener Stadien von Kontrolltieren (*white<sup>1118</sup>*) (grau) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (blau) in Abhängigkeit des Alters der Elterntiere. Kontrolle (Tag 5 = 76 ± 6,35 (Stadien 1-6), 20,14 ± 3,29 (Stadien 7-12), 28,71 ± 2,43 (Stadien 13 und 14) n = 7; Tag 9 = 57,33 ± 5,82 (Stadien 1-6), 17,17 ± 5,42 (Stadien 7-12), 20,67 ± 4,76 (Stadien 13 und 14) n = 6; Tag 13 = 40,17 ± 10,02 (Stadien 1-6), 15,08 ± 8,25 (Stadien 7-12), 5,17 ± 5,72 (Stadien 13 und 14) n = 12) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (Tag 5 = 59 ± 21,42 (Stadien 1-6), 18 ± 6,24 (Stadien 7-12), 8,8 ± 4,82 (Stadien 13 und 14) n = 5; Tag 9 = 46,83 ± 13,61 (Stadien 1-6), 9,83 ± 4,35 (Stadien 7-12), 3,67 ± 1,63 (Stadien 13 und 14) n = 6; Tag 13 = 29,67 ± 8,8 (Stadien 1-6), 2,67 ± 1,21 (Stadien 7-12), 1 ± 1,26 (Stadien 13 und 14) n = 6).

**(G')** Schematische Darstellung von verschiedenen Oozytenstadien, die zur Einteilung in G dienen. **(H)** Anzahl an Oozyten apoptotischer Stadien von Kontrolltieren (*white<sup>1118</sup>*) (grau) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (blau) in Abhängigkeit des Alters der Elterntiere. Kontrolle (Tag 5=  $0 \pm 0$  n= 7; Tag 9 =  $2,33 \pm 2,25$  n = 6; Tag 13 =  $2,83 \pm 3,19$  n = 12) und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Mutanten (Tag 5=  $1,67 \pm 1,63$  n = 5; Tag 9 =  $3,17 \pm 2,93$  n = 6; Tag 13 =  $6 \pm 2,68$  n = 6). T-Test mit folgenden P-Werten: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p = 0.005$ , nicht signifikant (n. s.) =  $p > 0.05$ . Mittelwert  $\pm$  SD.

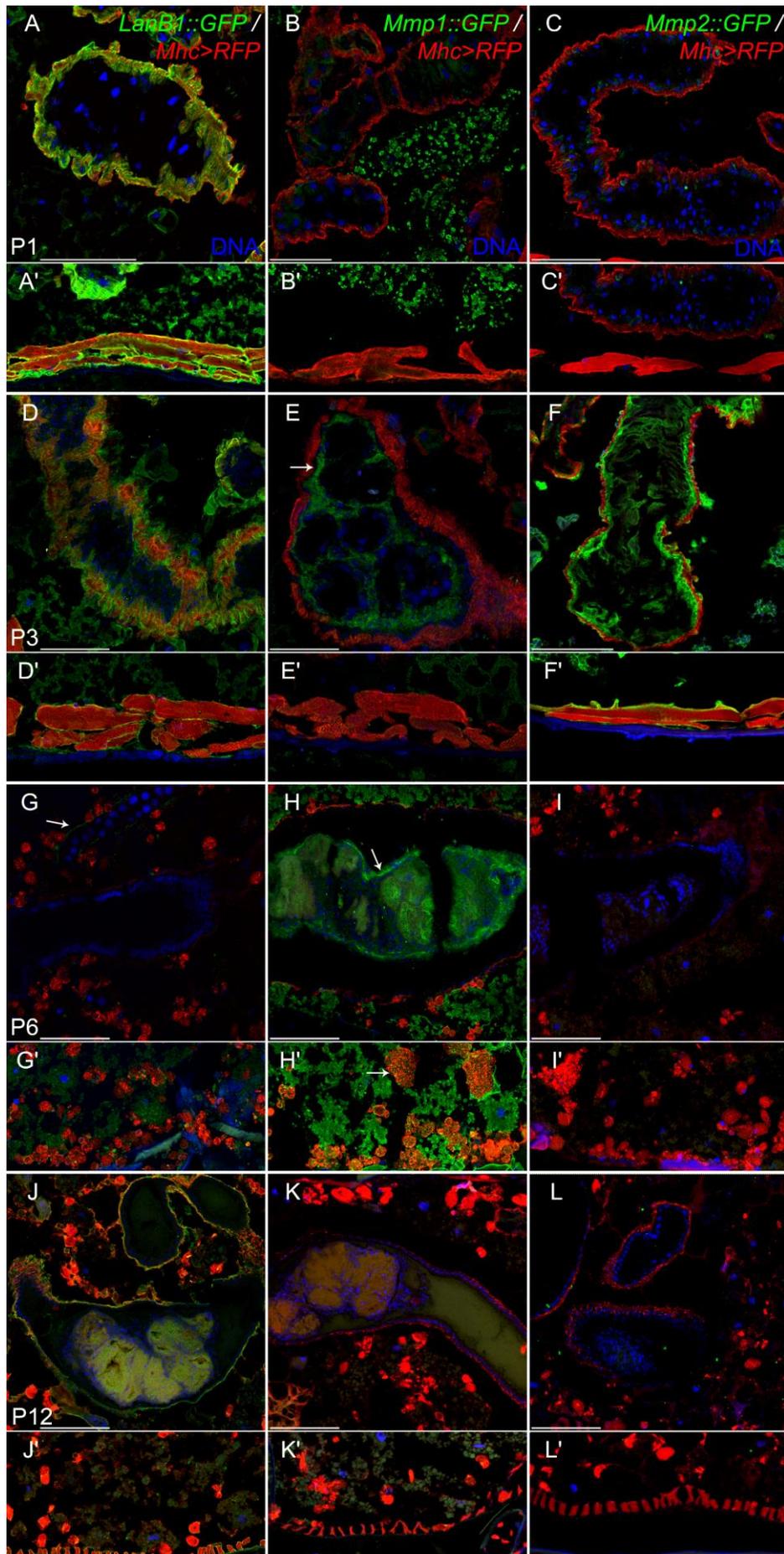
### 5.3. Die Rollen von Matrix Metalloproteinasen für die ECM-Remodellierung während der Metamorphose

#### 5.3.1. ECM Degradierung und Mmp Lokalisation während der Metamorphose

Für den Abbau der ECM sind Matrix Metalloproteinasen verantwortlich, die die Proteine der ECM spalten. Um die spezifischen Rollen der beiden Homologe in *Drosophila* für die Remodellierung der ECM während der Metamorphose zu untersuchen, wurde zunächst die Proteinverteilung auf zellulärer Ebene analysiert. Dazu wurden histologische Kryo-Schnitte von Puppen angefertigt, die GFP-Fusionsproteine von *LanB1*, *Mmp1* und *Mmp2* exprimieren.

Zu Beginn der Puppenphase (P1) umhüllt die BI die viszerale und somatische Muskulatur sowie den Fettkörper (Abb. 22A und A'). Zu diesem Zeitpunkt wurde *Mmp1* in den Fettkörperzellen und schwach in den Mitteldarmzellen detektiert (Abb. 22B und B'), während *Mmp2* lediglich schwach in den Mitteldarmzellen vorhanden war (Abb. 22C und C'). Im Puppenstadium P3 war *LanB1* noch schwach um die Muskulatur und den Fettkörper vorhanden (Abb. 22D und D'). *Mmp1* konnte im Fettkörper und um die proliferierenden adulten Mitteldarmvorläuferzellen (Abb. 22E und E', Pfeil) detektiert werden, welche ab diesem Zeitpunkt beginnen, die larvalen histolysierenden Mitteldarmzellen zu umschließen. *Mmp2* war sehr stark zwischen den larvalen Mitteldarmzellen und der viszeralen Muskulatur lokalisiert, wo sich beide Gewebe eine BI teilen, sowie um die somatische Muskulatur und im Fettkörper zu finden (Abb. 22F und F'). Im Stadium P6 ließ sich *LanB1* lediglich um die Malpighischen Gefäße detektieren, die die Metamorphose überdauerten (Abb. 22G, Pfeil). *Mmp1* war im Fettkörper, in adulten Mitteldarmvorläuferzellen, die den pupalen Mitteldarm ausbilden (Abb. 22H, Pfeil), und an Zellresten der somatischen Muskulatur detektierbar (Abb. 22H', Pfeil). *Mmp2* ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr exprimiert. Zum Ende der Metamorphose (P12) ist *LanB1* wieder um den Fettkörper, die viszerale und die somatische Muskulatur angelagert, während keine *Mmp* Lokalisation mehr beobachtet werden konnte (Abb. 22J-L').

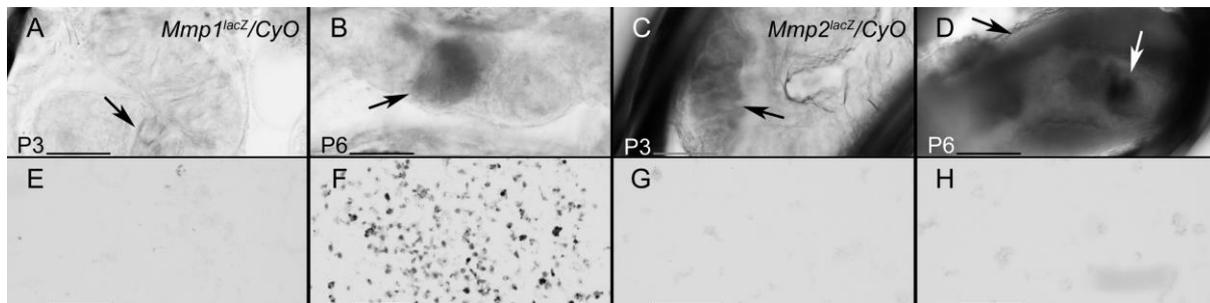
**Abbildung 22 (nachfolgende Seite): Proteinverteilung von Mmp1, Mmp2 und Laminin B1 während der Metamorphose.** Anti-GFP (grün) und Anti-RFP (rot) Antikörperfärbung an Puppen mit den Genotypen: *LanB1::GFP* (A, A', D, D', G, G', J, J'), *Mmp1::GFP* (B, B', E, E', H, H', K, K') und *Mmp2::GFP* (C, C', F, F', I, I', L, L') und jeweils *Mhc-GAL4, UAS-mCD8::RFP*. Puppen im Stadium P1 (A-C'), P3 (D-F'), P6 (G-I') und P12 (J-L'). Die BI um den Mitteldarm und um die somatische Muskulatur, markiert durch *LanB1::GFP*, wurde bis zum Stadium P6 komplett abgebaut (G und G') und anschließend bis zum Stadium P12 wieder aufgebaut (J und J'). Die Proteinlokalisierung von *Mmp1* konnte im Fettkörper (B, B', H, H') und dem kontrahierenden larvalen Mitteldarm (H) detektiert werden. Die Proteinlokalisierung von *Mmp2* konnte im larvalen Mitteldarmepithel (F) und der Muskulatur (F und F') detektiert werden. Messbalken = 100 µm.



### 5.3.2. Expression von Mmps während der Metamorphose

Die sich unterscheidende Proteinlokalisierung der beiden Mmps deutet auf sich unterscheidende Rollen für die Degradierung der ECM während der Metamorphose hin. Zur weiteren Analyse wurden durch P-Element Insertion generierte *lacZ*-Reportergergen Fliegenlinien genutzt (Spradling et al., 1999), um den Expressionsort und -zeitpunkt untersuchen zu können.

Die hier analysierte LacZ-Reporterexpression spiegelt im Fall von *Mmp1* die *cis* regulatorische Aktivität der etwa 600 bp vor dem proteincodierenden Bereich des zweiten Exons liegenden Enhancer wider. Die Reporterexpression wurde in den Stadien P3 und P6 schwach in den larvalen Mitteldarmprimordien oder im transienten pupalen Mitteldarm (für P3 Abb. 23A, Pfeil und für P6 Abb. 23B, Pfeil) detektiert und wurde außerdem in Hämocyten im Stadium P6 stark exprimiert (Abb. 23F). Die Insertion der *Mmp2<sup>lacZ</sup>* Reportergergenlinie ist etwa 18 kb nach dem ersten Transkriptionsstart lokalisiert und zeigt Expression im larvalen Mitteldarmepithel und/oder im transienten pupalen Mitteldarm (für P3 Abb. 23C, Pfeil und für P6 Abb. 23D, weißer Pfeil) sowie Signal an der Mitteldarmoberfläche (Abb. 23D, schwarzer Pfeil), während in Hämocyten kein Signal detektiert werden konnte (Abb. 23G und H).



**Abbildung 23: Expression von Mmps.** (A, B, E, F) Galaktosidase-Expression von *Mmp1<sup>lacZ</sup>* im larvalen Mitteldarm in den Stadien P3 (A) und P6 (B) sowie Expression in einigen Hämocyten im Stadium P3 (E) und in den meisten Hämocyten im Stadium P6 (F). (C, D, G, H) Galaktosidase-Expression von *Mmp2<sup>lacZ</sup>* im larvalen Mitteldarm des Stadium P3 (D) sowie P6 mit Expression im gesamten Mitteldarm (D), während die Hämocyten kein Signal zeigen (G, H). Darstellung mittels X-Gal Färbung an präparierten Mitteldärmen (B, C, D, E, F, G) und Hämocyten (B', C', D', E', F', G'). Messbalken = 100 µm.

### 5.3.3. Letalität von *Mmp* Allelen

Für funktionelle Analysen wurde die Letalität der zuvor genutzten P-Element Insertionen und weiteren bereits beschriebenen Allelen, bzw. Fliegenlinien mit Insertionen im entsprechenden Locus, ermittelt. Nach Kreuzung und Generierung von transheterozygoten Tieren, wurde die Letalität weiter überprüft, um eventuelle „*second site hits*“ auszuschließen. Des Weiteren wurde eine potentielle genetische Interaktion durch Kreuzung von *Mmp1* mit *Mmp2* Allelen getestet.

Homozygote Tiere des Genotyps *Mmp1<sup>lacZ</sup>* sind letal. Kreuzungen mit den ebenfalls zur Letalität führenden Mutationen *Mmp1<sup>2</sup>*, bei der die Exone 3, 4 und 5 deletiert wurden, sowie dem EMS-Allel *Mmp1<sup>Qstop112</sup>*, bei dem ein Stopp-Codon kurz nach der Pro-Domäne liegt, führen ebenfalls zur Letalität (Tab. A2; Page-McCaw et al., 2003). Die im *Mmp2* Locus untersuchten P-Element Insertionen führen homozygot wie auch jeweils transheterozygot zueinander allesamt zu Letalität. Dabei handelt es sich bei *Mmp2<sup>Mi02914</sup>* um eine Insertion, die im nicht codierenden Bereich liegt. *Mmp2::eGFP* ist eine Exon-Trap Linie, die ein nicht funktionelles Protein hervorbringt, welches aber korrekt lokalisiert wird (Zhai

et al., 2015). Auch hier ist die Störung der Genregulation durch die *lacZ*-Insertion ausschlaggebend für die Letalität (Tab. A2).

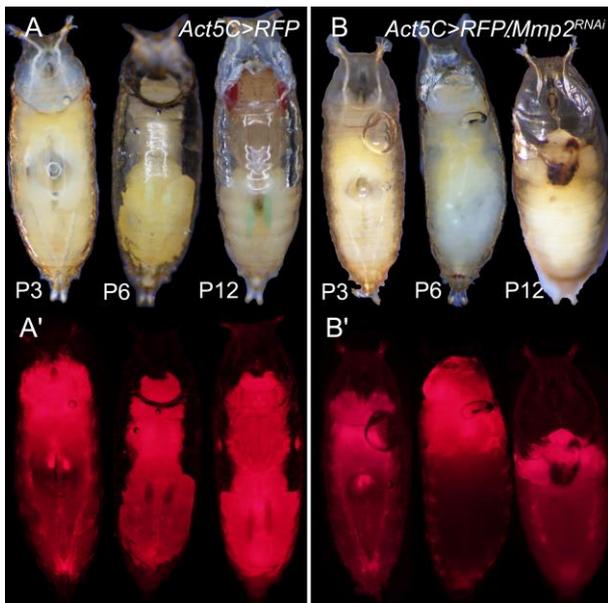
Um den Zeitpunkt der durch die *lacZ*-Insertionen verursachten Letalität zu bestimmen, wurde der Anteil der homozygoten Tiere im Verhältnis zu balancierten Tieren während der Larvalstadien bestimmt. Da homozygote Balanciertiere embryonal letal sind, liegt die erwartete Verteilung ab dem ersten Larvalstadium bei 33,3 % homozygoter und 66,6 % heterozygoter Tiere, solange es nicht zum Funktionsverlust kommt. Die Ergebnisse zeigten im *Mmp1<sup>lacZ</sup>* Stock einen Anteil homozygoter Tiere von 27,61 % ± 2,8 % im ersten, 16,75 % ± 3,8 % im zweiten und 0 % ± 0 % im dritten Larvalstadium (Abb. A6A) und für *Mmp2<sup>lacZ</sup>* 30,11 % ± 4,77 % im ersten, 23,93 % ± 2,45 % im zweiten und 5,73 % ± 5,02 % im dritten Larvalstadium (Abb. A6B). In beiden Linien kam es dementsprechend zu einer steigenden Letalität über die Larvalstadien hinweg. Die *Mmp2<sup>lacZ</sup>* Tiere, die sich verpuppten, starben während der Metamorphose. Dabei konnten Defekte in Form von fehlender Dissoziation des Fettkörpers, ein ausbleibender Abbau der larvalen Gewebe und ein melanisiertes, tumorartiges, am Darm angeheftetes Kompartiment detektiert werden (Abb. A8).

#### 5.3.4. *Mmp2* Knockdown während der Metamorphose

Um die spezifische Rolle von *Mmp2* während der Metamorphose zu untersuchen, wurde ein Knockdown ab dem späten dritten Larvalstadium durchgeführt. Die Expression der dsRNA erfolgte im Expressionsmuster des ubiquitären GAL4-Treibers *Act5C-GAL4* und wurde mittels Expression des *UAS-mCD8::RFP* Reportergerkonstruktes kontrolliert und nachverfolgt. Die Auswirkung des Knockdowns wurde mittels Letalitätstest sowie die nach Phänotypen hin analysiert.

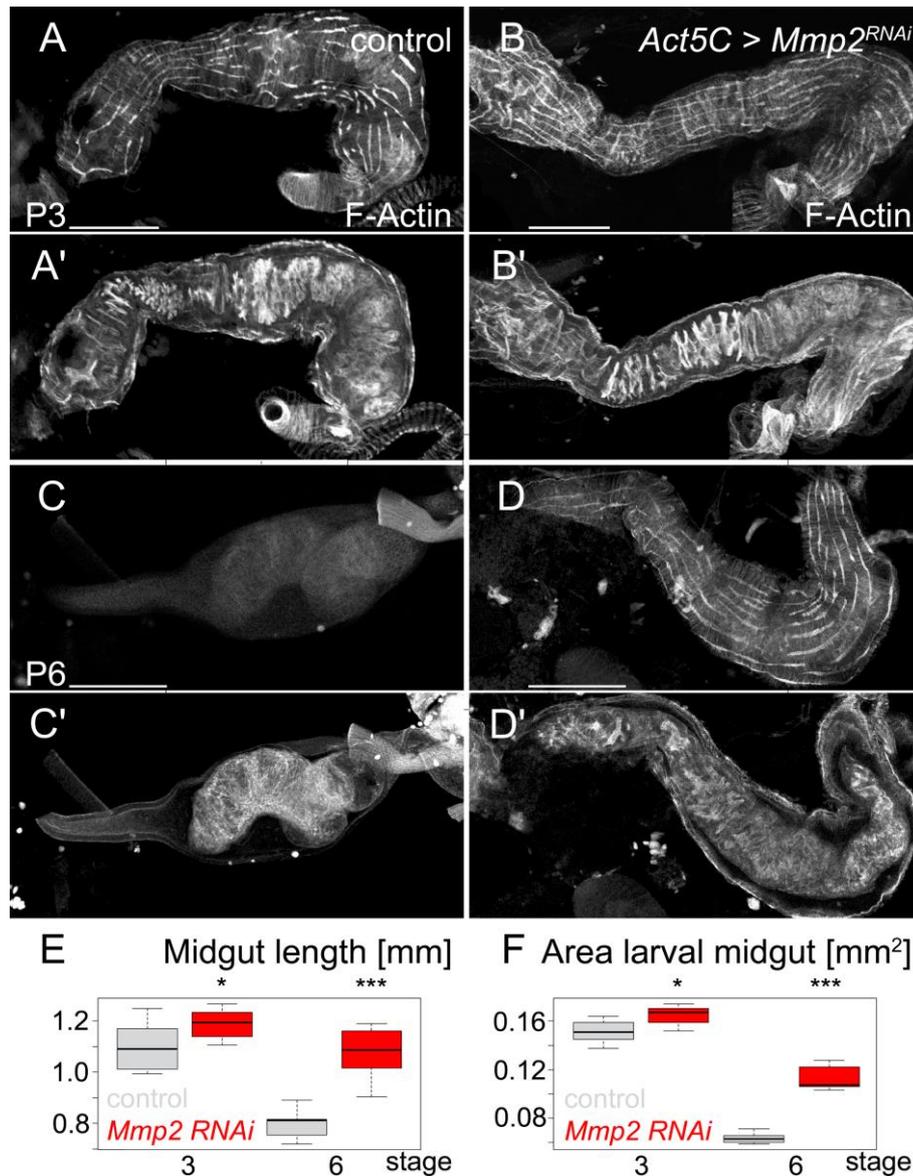
Der Letalitätstest wurde zur Kontrolle und im Kontext des temperatursensitiven GAL4/UAS-Hintergrundes bei 20 °C sowie im theoretischen Optimum von 29 °C durchgeführt (Brand and Perrimon, 1993). Zur Kontrolle wurde die Linien *white<sup>1118</sup>*, *Act5C-GAL4*, *UAS-mCD8::RFP* und *UAS-Mmp2-RNAi* genutzt, die allesamt eine leicht gesteigerte Letalität bei 29 °C aufzeigten.

Die Normalentwicklung zeigte während der Puppenphase die Ausbildung einer Luftblase im Stadium P3, der Dissoziation des Fettkörpers, den grün werdenden Malpighischen Tubuli sowie initiale Ausbildung der adulten Grundgestalt im Stadium P6 und der fast abgeschlossenen Metamorphose im Stadium P12, bei der nur noch die Malpighischen Tubuli sowie der Gelbkörper (der larvale Darmrest im differenzierten adulten Mitteldarm) als noch zu inkorporierende Reste äußerlich zu detektieren waren (Abb. 24A und A'). Der Knockdown von *Mmp2* führte bei 29 °C bei allen untersuchten Tieren und bei 20 °C zu einer gesteigerten Letalität (Abb. A7). Der bei 29 °C resultierende Phänotyp äußert sich in einer ausbleibenden Dissoziation des Fettkörpers, dem Auftreten eines melanisierten Gewebes, dem Ausbleiben der optischen Veränderung von Malpighischen Tubuli sowie dem Auftauchen des Gelbkörpers an der Puppenoberfläche und einem abschließenden Zerfall der Gewebe (Abb. 24B und B').



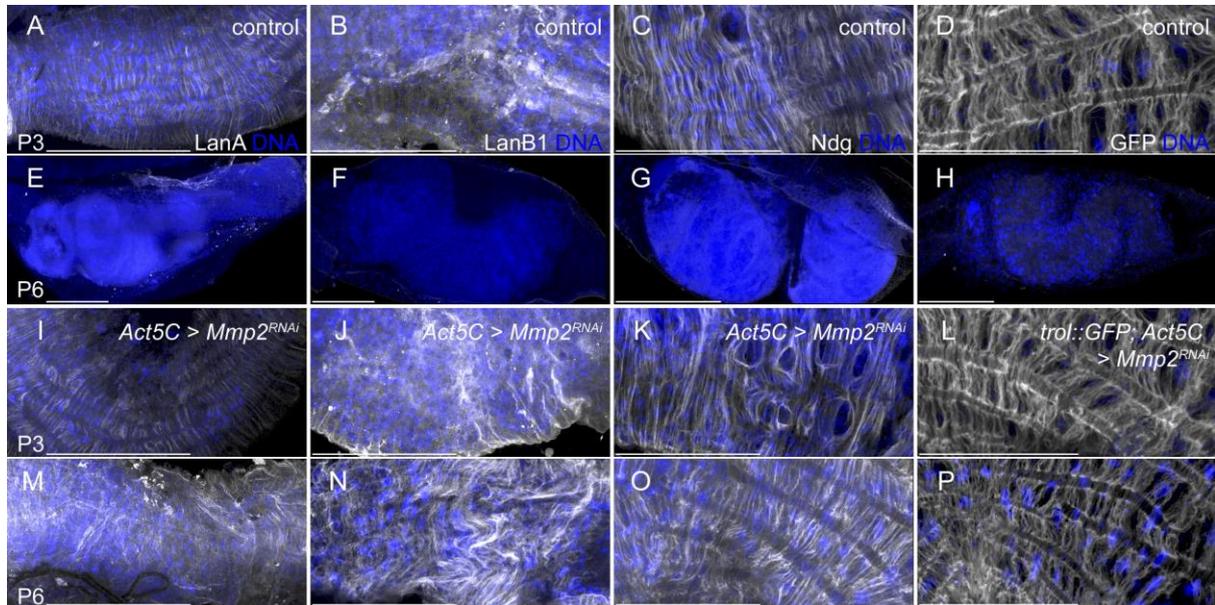
**Abbildung 24: Letalität nach *Mmp2* Knockdown während der Metamorphose. (A)** Morphologie von wildtypischen Puppen der Stadien P3, P6 und P12 mit dem Genotyp *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP*. **(A')** RFP Expression der entsprechenden Stadien aus A. **(B)** Morphologie von Puppen mit dem Genotyp *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP, UAS-Mmp2-RNAi* und der gleichen Entwicklungszeit von Kontrolltieren der Stadien P3, P6 und P12. **(B')** RFP Expression der entsprechenden Stadien aus B. Die Haltung erfolgte bei 29 °C.

Zur Analyse der zuvor beschriebenen Defekte wurde die Remodellierung des Mitteldarms nach Knockdown von *Mmp2* untersucht. In Kontrolltieren kommt es in der viszeralen Muskulatur bis zum Stadium P6 zum Abbau des kontraktile Apparates. Die drei- bis fünfkernigen longitudinalen sowie die zweikernigen zirkulären Muskeln dedifferenzieren zu Myoblasten mit ein bis drei, respektive einem Kern bevor es danach wieder zur Redifferenzierung kommt (Abb. 25A und C). Das larvale Mitteldarmepithel wird von einem Teil der ab dem dritten Larvalstadium proliferierenden adulten Mitteldarmstammzellen umschlossen, während der andere Teil den adulten Mitteldarm bildet. Im Stadium P6 ist der larvale Mitteldarm bereits stark kondensiert (Abb. 25C'). In Tieren, in denen *Mmp2* im Expressionsmuster von *Actin5C* durch RNAi herunterreguliert wurde, kommt es bei gleicher Entwicklungsdauer im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren zu einer fehlenden Auflösung des kontraktile Apparats der viszerale Muskulatur (Vergleich Abb. 25C mit D). Zudem wird der larvale Mitteldarm nicht korrekt kondensiert. Die Länge des Mitteldarms, die in Kontrolltieren stark abnimmt, ist in Tieren mit *Mmp2* Knockdown hoch signifikant länger (Abb. 25E). Zusätzlich ist die Fläche des larvalen Mitteldarms in Tieren, die dem Stadium P6 entsprechen, signifikant größer, als die von Kontrolltieren (Abb. 25F). Interessanterweise unterscheiden sich die vergleichenden Werte zwischen *Mmp2* Knockdown des Stadiums P6 zum Stadium P3 von Kontrolltieren und Tieren mit *Mmp2* Knockdown nicht signifikant. Dieser Zusammenhang deutet auf eine Entwicklungsstörung, die eine Weiterentwicklung des Darmtraktes ab dem Stadium P3 verhindert.



**Abbildung 25: *Mmp2* Phänotyp des Mitteldarms. (A und A')** Kontrolltiere (*Act5C-GAL4/CyO*, *Dfd-YFP*) und **(B und B')** Tiere mit *Mmp2* Knockdown (*Act5C-GAL4 > UAS-Mmp2-RNAi*) im Stadium P3. **(A und A')** Kontrolltiere und **(B und B')** Tiere mit *Mmp2* Knockdown im Stadium P6. (A, B, C, D) Fokusebene auf die Oberfläche des Mitteldarms und der viszeralen Muskulatur. (A', B', C', D') Fokusebene auf das Lumen des Mitteldarms und das larvale Mitteldarmepithel. Messbalken = 100  $\mu$ m. **(E)** Quantifizierung der Mitteldarmlänge von Kontrolltieren (graue Boxen) und Tieren mit *Mmp2* Knockdown (rote Boxen) in den Stadien P3 und P6. Kontrolltiere: P3 = 1,01 mm  $\pm$  0,1 mm; P6 = 0,79 mm  $\pm$  0,06 mm. *Mmp2* Knockdown-Tiere: P3 = 1,19 mm  $\pm$  0,07 mm; P6 = 1,08 mm  $\pm$  0,1 mm. **(E')** Quantifizierung der Mittelfläche des larvalen Mitteldarmepithels von Kontrolltieren (graue Boxen) und Tieren mit *Mmp2* Knockdown (rote Boxen) in den Stadien P3 und P6. Kontrolltiere: P3 = 0,15 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0,01 mm<sup>2</sup>; P6 = 0,06 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0 mm<sup>2</sup>. *Mmp2* Knockdown-Tiere: P3 = 0,16 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0,01 mm<sup>2</sup>; P6 = 0,11 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0,01 mm<sup>2</sup>. T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\* p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p  $\leq$  0.005, nicht signifikant (n. s.) = p > 0.05. Mittelwerte  $\pm$  SD. n=7.

Da Matrix Metalloproteinasen für die Degradierung von ECM Komponenten verantwortlich sind, wurde die Komposition der ECM auf dem in der Metamorphose befindlichen Mitteldarm zwischen Kontrolltieren und in der *Mmp2* Knockdown Situation untersucht. Hierzu wurden die Komponenten LanA, LanB1, Ndg und Perlecan Proteine durch Nachweis von Antikörpern oder im Fall von Perlecan mittels GFP-Markierung einer GFP Exon-Trap Linie durchgeführt. Während in Kontrolltieren zwischen den Stadien P3 und P6 die ECM abgebaut wurde (Abb. 26A-H), konnten alle untersuchten Proteine nach *Mmp2* Knockdown unverändert detektiert werden (Abb. 26I-P).



**Abbildung 26: ECM Komposition nach *Mmp2* Knockdown.** (A, E, I, M) Proteinverteilung der LanA-Antikörperfärbung. (B, F, J, N) Proteinverteilung der LanB1-Antikörperfärbung. (C, G, K, O) Proteinverteilung der Ndg-Antikörperfärbung. (D, H, L, P) (A-H) Kontrolltiere mit den Genotypen: *Act5C-GAL > UAS-mCD8::RFP* (A-C, E-G) und *trol::GFP; Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP* (D und H). *Mmp2* Knockdown mit den Genotypen *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP*, *UAS-Mmp2-RNAi* (I-K und M-O) sowie *trol::GFP; Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP, UAS-Mmp2-RNAi* (L und P).

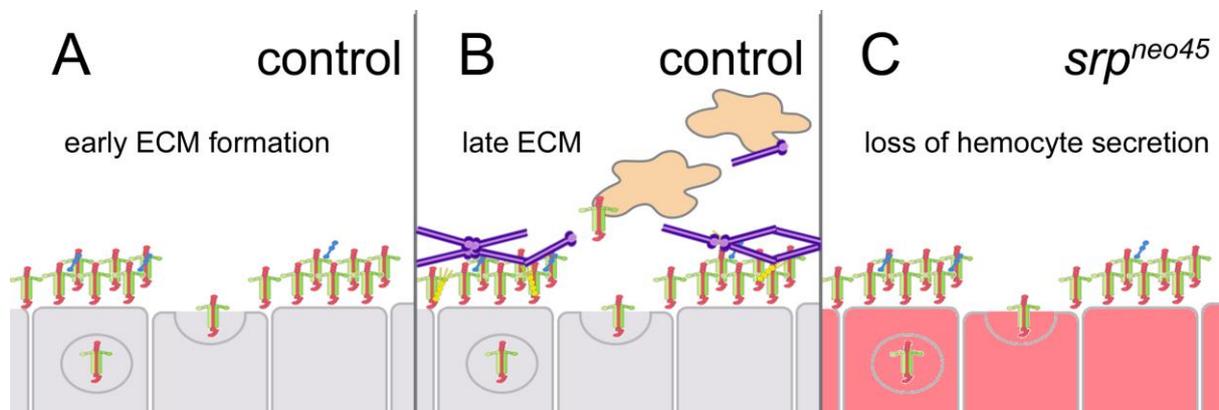
## 6. Diskussion

### 6.1. Laminin wird gewebespezifisch exprimiert

Laminine sind die entscheidenden Elemente für die initiale Konstruktion der Bl. Die Quelle eines frühen Laminin-Netzwerkes wurde bislang nicht hinterfragt. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen eine gemeinsame gewebespezifische Genexpression von *LanB1* und *LanB2* und die Identifizierung von *cis*-regulativen Modulen (CRM) für diese gewebespezifische Sekretion. Die Expression der *Laminin B1* und *B2* Untereinheiten ist essentiell für die darauffolgende Di- und Trimerisierung und reflektiert den Beginn der initialen ECM-Formierung. Ich halte die strikte genetische Regulation der frühen ECM für eine essentielle Grundvoraussetzung und ein Signal für die folgende zufällige Assemblierung. Daraus resultiert die Frage, ob die gewebespezifische Sekretion von Laminin ausreicht, um die hier so benannte „frühe ECM“ auszubilden und wie diese ECM zusammengesetzt ist, wenn Hämozyten als Hauptproduzenten von ECM Proteinen fehlen. Dazu wurde ein Laminin-Netzwerk identifiziert, welches den Mitteldarm, die somatische Muskulatur und das ZNS umgibt. Die Differenzierung dieser Organe verläuft bis zum Ende der Embryonalentwicklung wildtypisch, wird allerdings nicht abgeschlossen. Es kommt zu einer gestörten Kammerung des Mitteldarms, Orientierungsdefekten der ventralen Myotuben und das ZNS weist kondensiert nicht vollständig, was charakteristisch für verschiedene ECM Phänotypen ist (Martinek et al., 2008; Olofsson and Page, 2005; Urbano et al., 2009). Dieses Experiment untermauert die Rolle der gewebespezifischen Laminin Sekretion als entscheidenden Schritt für die Initiierung der ECM und reduziert die Rolle der Hämozyten und die damit verbundene starke Sekretion von ECM Komponenten (Matsubayashi et al., 2017) auf die terminale Differenzierung von Organen. Embryonale Gewebe sind also in der Lage, ihre individuelle und initiale Laminin Sekretion von sich aus zu steuern. Diese Ergebnisse eröffnen eine neue Sichtweise auf die Laminin Formierung *in vivo*, in der das früheste Laminin-Netzwerk auf gewebeeigene Expression zurückgreift.

Des Weiteren implizieren diese Ergebnisse Unterschiede zwischen einer „frühen“ und einer ausgereiften ECM, die anhand der Proteinverteilung am embryonalen Mitteldarm nachverfolgt wurde. Darüber hinaus konnte die Komposition der „frühen ECM“ als Laminin-Netzwerk, welches schon mit dem Linker-Protein Nidogen verwoben ist, identifiziert werden. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der frühen Expression dieser Proteine (Wolfstetter et al., 2019). Während Perlecan wie Laminin-Untereinheiten und Nidogen bereits frühembryonal exprimiert wird (Friedrich et al., 2000), wird für die beiden Kollagen IV codierenden Gene, lediglich spätembryonale Expression im Fettkörper und in Hämozyten postuliert (Mirre et al., 1988; Monson et al., 1982; Natzle et al., 1982; Le Parco et al., 1986; Yasothornsrikul et al., 1997). Im Gegensatz zur voll ausdifferenzierten ECM ist die „frühe ECM“ durch die Abwesenheit der Kollagen-Schicht und der unvollständigen Inkorporation von Perlecan, welches Kollagen für die korrekte Lokalisation benötigt (Matsubayashi et al., 2017; Pastor-Pareja and Xu, 2011), charakterisiert. Dabei liegt die Ursache in der fehlenden Sekretion von Kollagen durch Hämozyten. Mutationen von Kollagen IV führen zu letalen Phänotypen in *Drosophila*, *C. elegans* und in Mäusen, ohne dabei die grundlegende Ausbildung der ECM zu beeinflussen (Borchiellini et al., 1996; Gupta et al., 1997; Pöschl et al., 2004). Der Verlust von Kollagen könnte zu ähnlichen Phänotypen mit nicht kompletter embryonaler Differenzierung führen. In den ektodermalen Darmanteilen konnte auch in Abwesenheit von Hämozyten Proteinauflagerung von Perlecan und Kollagen IV detektiert werden. Dieser Befund suggeriert eine gewebespezifische Expression von allen essentiellen ECM Komponenten in diesem Gewebe. Während die Mitteldarmprimordien eine

epitheliale mesenchymale Transition durchlaufen, um in das Zentrum des Embryos zu migrieren, bleiben die ektodermalen Darmanlagen epithelial und werden passiv mitgezogen (Skaer, 1993). Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die „frühe“ extrazelluläre Matrix den Zellen eine gewisse Mobilität erlaubt, die für die während der Embryonalphase stattfindenden Migrationsprozesse benötigt werden. Die ausdifferenzierte ECM verhilft Geweben und Organen durch höhere Stabilität mit einer verstärkten, steiferen ECM (Abb. 27).



**Abbildung 27: Schema der frühen und differenzierten ECM. (A)** In der Embryonalentwicklung wird am Beispiel des Mitteldarms zuerst eine frühe ECM durch gewebespezifische Expression gebildet. **(B)** Durch spätembryonale Expression von ECM Komponenten durch Hämozyten und Fettkörper wird die terminale ECM des Mitteldarms differenziert, wobei die Lokalisation von Perlecan und Kollagen IV von der Hämozytensekretion abhängt. **(C)** In *srp<sup>neo45</sup>* Mutanten sind Hämozyten nicht differenziert. Ohne die Sekretion der Hämozyten von ECM Komponenten kommt es zu einer gestörten Entwicklung.

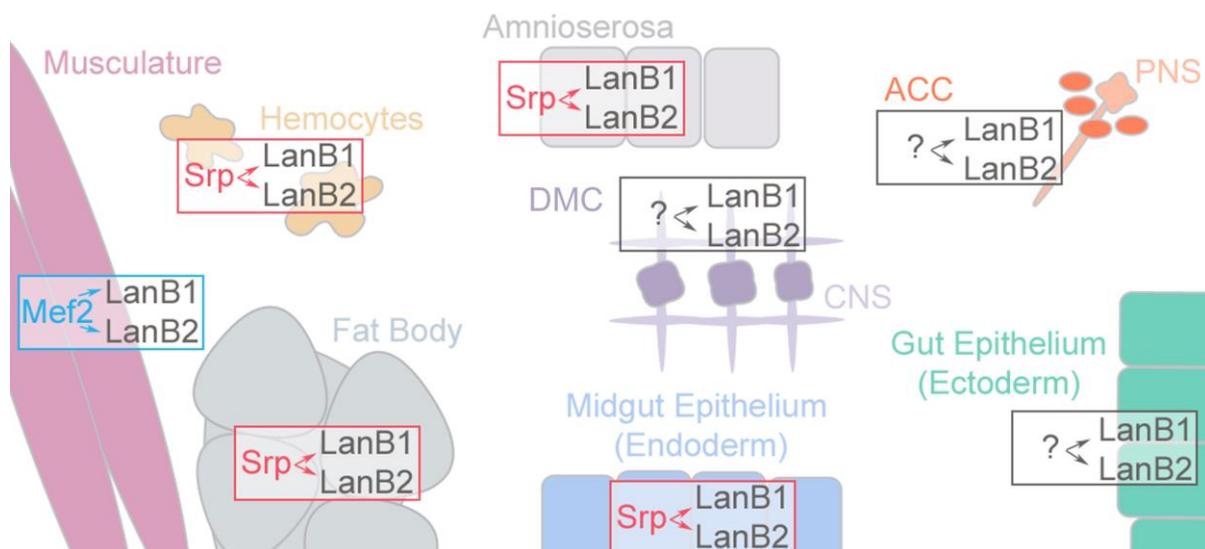
Im Ovar sind Unterschiede der Kollagensekretion bekannt. Während das Follikelzellepithel Kollagen IV zellautonom sekretiert, kommt es bei der Differenzierung der Keimbahnstammzellen zu einer Sekretion durch Hämozyten, die für die wildtypische Differenzierung dieser Zellen eine Rolle spielt. Nach Knockdown von Kollagen IV in Hämozyten ist die Anzahl der Zellen, welche sich in der Stammzellnische befinden, vergrößert (van de Bor et al., 2015). Zusammen genommen zeigen diese Befunde, dass die im Kontext der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse auf eine starke Abhängigkeit der Gewebedifferenzierung von einer streng geregelten räumlichen und zeitlichen Auflagerung von ECM-Schichten hindeuten.

## 6.2. Serpent ist der wichtigste Regulator für *Laminin B1* und *Laminin B2*

Laminine werden über alle Keimblätter hinweg exprimiert (diese Arbeit, Montell and Goodman, 1988, 1989; Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012) und ein initiales Laminin-Netzwerk, welches für komplexe entwicklungsbiologische Prozesse wie Zellmigration und Organogenese benötigt wird (Sánchez-Sánchez et al., 2017; Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012; Yarnitzky and Volk, 1995), besteht bereits bevor weitere ECM Komponenten sekretiert werden (diese Arbeit, Matsubayashi et al., 2017). Das vielseitige Expressionsmuster und die diversen Funktionen suggerieren komplexe Regulationsmechanismen. In dieser Arbeit wurde *Srp*, der wichtigste GATA Transkriptionsfaktor für die Entwicklung von *Drosophila*, als Gewebe und Keimblatt übergreifender Regulator für die CRM von *Laminin B1* und *B2* identifiziert. Zusätzlich scheint die Expression von Laminin in myogenen Geweben von *Mef2* abhängig zu sein. *Srp* wird in diversen Geweben exprimiert. In diesem Kontext ist es naheliegend, dass *Srp* auch Laminine in diversen Geweben reguliert. Eine spezielle Rolle nehmen mesenchymale Zellen für die Expression von Laminin ein. Hämozyten und der

Fettkörper zeigen die höchste Laminin Expression und die dorsalen Mittelzellen (*dorsal median cells*) scheinen die gewebespezifischen Produzenten für das gesamte ZNS zu sein.

Im Hintergrund der Reporter-gen-Expression von *LanB1* sind die ChIP-qPCR-Ergebnisse naheliegend, da *LanB1 IE5'* nur Laminin Expression in der Amnioserosa aufzeigte, welche von Srp reguliert sein kann. Dieses Gewebe persistiert lediglich in der ersten Hälfte der Embryonalentwicklung und durchläuft anschließend einen programmierten Zelltod (Frank and Rushlow, 1996). Dadurch konnte nur eine kleine Fraktion von Zellen die Anreicherung von Srp in diesem Ansatz beeinflussen. Im Gegensatz dazu, zeigte *LanB1 IE 3'* hohe Srp Anreicherung und starke Reporter-gen-Expression im Entoderm, Hämocyten und im Fettkörper, deren Determinierung und Differenzierung von Srp abhängen. Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass Hämocyten die Hauptproduzenten für sekretierte ECM Proteine sind (Matsubayashi et al., 2017). Auch die Daten für *LanB2* stimmen mit den zuvor gezeigten Reporter-gen-Analysen überein, da *LanB2 UE-GFP* Embryonen keine Reporter-gen-Expression und *LanB2 IE 5'-GFP* und *LanB2 IE 3'-GFP* Srp abhängige Expressionsmuster aufzeigten. Die starke Anreicherung von Srp in den beiden Regionen der *LanB2 IE* Konstrukte und die stärkste Anreicherung im Bereich von *LanB1 IE 3'* indizieren, dass die Hämocyten und Fettkörper Regulation den höchsten Effekt in diesem Experiment bewirkten. Die im Vergleich zu *LanB2 IE* etwa doppelt so hohe Anreicherung in *LanB1 IE 3'* lässt auf eine doppelte Anzahl von detektierten Bindestellen schließen. Zusätzlich deckte die Anreicherung im Bereich von *LanB1 IE 5'* eine direkte Bindung von Srp in der Amnioserosa auf.



**Abbildung 28: Schema der transkriptionellen Regulation von Laminin B1 und Laminin B2.** Die in dieser Arbeit gezeigten Daten deuten auf eine gewebeübergreifende Regulation von Srp für *LanB1* und *LanB2* im Fettkörper, in Hämocyten, im Mitteldarmepithel und in der Amnioserosa. Zusätzlich bindet Mef2 an LanB1 und LanB2 für die Laminin Regulation in der Muskulatur. Transkriptionsfaktoren, die für die Laminin Regulation in den Helferzellen des PNS, den dorsalen Medianzellen des ZNS sowie die Expression im ektodermalen Darmepithel entscheidend sind, wurden noch nicht identifiziert. Abkürzungen: ACC: Nebenzellen (*accessory cells*), DMC: dorsale Mittelzellen (*dorsal median cells*).

Das Gain-of function Experiment belegt, dass die Expression von Srp ausreicht, um die Enhancer von *LanB1* und *LanB2* zu aktivieren. Interessanterweise führte die ektopische Expression von Srp auch zu einer massiven Störung der Myoblastenfusion, die an Fusionsmutanten erinnern (Berger et al., 2008;

Hamp et al., 2016; Kaipa et al., 2013; Schäfer et al., 2007). Es konnten auch am Ende der Morphogenese unfusionierte Myoblasten und falsch orientierte Muskelzellen im gesamten viszeralen und somatischen Mesoderm detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle für eine gewebespezifische Aktivität dieses Transkriptionsfaktors und der nachfolgenden Genregulation hin.

Nachfolgend stellt sich die Frage, wie die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse in einen evolutionären Kontext einzuordnen sind. Während in *Drosophila* Srp der wichtigste GATA Transkriptionsfaktor ist, teilt sich die Spezifität der Vertebraten GATA Homologe für die Differenzierung der unterschiedlichen Gewebe auf (Rehorn et al., 1996). In diesem Kontext ist die Bindung von Srp an die hier vorhergesagte GATA-TFBS (Zhu et al., 2011) ein interessanter Befund, da diese Bindestelle mithilfe einer *Position weight matrix* (PWM) gefunden wurde (Whyatt et al., 1993), die aus Daten von Bindung durch Maus GATA-1 kreiert wurde. Die Rolle von Srp für die Hämatopoese scheint bis in die Vertebraten Entwicklung konserviert zu sein, da auch GATA-1 eine differenzierende Rolle für rote Blutkörperchen einnimmt (Pevny et al., 1991). Die hier als GATA-TFBS benannte Bindestelle scheint also eine zu Gata-1 nahverwandte Bindestelle von Srp zu sein, während die hier so genannten Srp-TFBS mehr Ähnlichkeiten zu Vertebraten GATA-4 und GATA-6 aufweisen (Khan et al., 2018). In kultivierten embryonalen Stammzellen der Maus kommt es bei Überexpression oder Verlust von GATA-4 und GATA-6 zu einer verstärkten, respektive verminderten Expression von Laminin-1 (Fujikura et al., 2002; Futaki et al., 2004). Diese Experimente belegen keine direkte Bindung von GATA Faktoren für die Laminin Regulation, im Zusammenhang dieser Arbeit wäre es aber interessant, welche GATA-Faktoren die regulative Rolle von Srp für die Laminin Regulation auch in Vertebraten übernehmen. Interessanterweise kommt es beim reziproken Verlust von GATA-4 oder GATA-6 in Tumorzellen, die aus Epithelien entstanden sind, zum anschließenden Verlust von Laminin Expression (Capo-chichi et al., 2003). Mit dem Wissen dieser Arbeit und unter der Annahme, dass GATA Faktoren die Rolle der Laminin Regulation in Vertebraten übernehmen, ergibt die starke Expression von GATA Faktoren in epithelialen Zellen Sinn. Diese Zellen benötigen Laminin Expression, um ihre BI zu versorgen und den epithelialen Charakter aufrecht zu erhalten. In Gegensatz dazu sind proliferierende Tumorzellen auf eine Degradierung der BI angewiesen, um auszuwachsen und schließlich zu metastasieren.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt diesen Gedanken, da dort eine gemeinsame Rolle von Srp und humanen GATA-4 und GATA-6 für die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) gezeigt wurde (Campbell et al., 2011). Obwohl sich die Funktionen für den Erhalt des epithelialen Charakters und die EMT widersprechen, wird Laminin Aktivierung auch in mesenchymalen Zellen für die Zellmigration benötigt (Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012). Da die Anwesenheit von Srp den epithelialen Charakter in *Drosophila* stört (Campbell et al., 2011), nehme ich eine Rolle von Srp für die initiale Aktivierung in allen *srp* abhängigen Geweben an, und eine darauffolgende Laminin Regulierung für den Erhalt epithelialer Gewebe, die durch andere GATA-Faktoren gewährleistet werden muss. Eine Rolle von dGATAe für den Erhalt von Genexpression im differenzierten Mitteldarmepithel wurde bereits gezeigt (Okumura et al., 2005) und dGATAa/Pannier ist an der Differenzierung der Amnioserosa beteiligt (Heitzler et al., 1996; Winick et al., 1993).

Ein weiterer Beleg für die regulative Rolle von Srp auf Laminin-Untereinheiten und darüber hinaus auf andere ECM Komponenten lässt sich anhand von RNA-Seq Daten belegen, die die Expression von Stammzellen und differenzierten Zellen des Testes vergleichen. Hierbei geht im Zuge der

Differenzierung die Expression von Srp und zugleich von ECM Komponenten verloren (Hof and Bökel, 2019). Ein interessanter Aspekt, der möglicherweise auf eine entscheidende Rolle von GATA Faktoren für den Erhalt von Stammzellnischen hindeutet. Bei Verlust von dGATAe in den Stammzellen des Mitteldarms kommt es zum Verlust der Proliferation und Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters dieser Zellen (Okumura et al., 2016). So kommt es auch bei Verlust von Perlecan in diesen Zellen zum Identitätsverlust des Stammzellcharakters (You et al., 2014). Diese Befunde weisen auf eine konservierte Funktion von GATA-Transkriptionsfaktoren für die Aufrechterhaltung der Stammzellnische durch Regulation von Lamininen und möglicherweise auch anderen ECM-Komponenten hin.

### 6.3. Nidogen ist nicht essentiell für die Assemblierung der Basallamina

Ndg bindet in Vertebraten Zellkulturen an Laminin über Bindung an die  $\gamma$ -Untereinheit (entspräche in *Drosophila LanB2*) über die dritte globuläre Domäne und an Kollagen und Perlecan über die zweite globuläre Domäne (Durkin et al., 1988b; Fox et al., 1991; Hopf et al., 2001; Mann et al., 1989; Reinhardt et al., 1993). Daraus schlussfolgernd wurde für das Linkerprotein Ndg eine Rolle in der Assemblierung von Komponenten der BI postuliert (Aumailley et al., 1993; Ho et al., 2008; Mayer et al., 1993, 1995). Passend zu dieser postulierten Funktion ist Ndg über das Tierreich hinweg vorhanden und wurde als hoch konserviert betrachtet. Durch vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz von *Ndg* Orthologen über diverse Taxa konnte tatsächlich ein hoher Grad an Konservierung in dieser Arbeit festgestellt werden. Diese Befunde unterstützen die postulierte Rolle als essentieller Linker zwischen den Netzwerken der BI.

Eine kürzlich publizierte Studie zeigt die Abhängigkeit der Ndg Lokalisation in die BI von der dritten globulären Domäne (Dai et al. 2018). Diese Daten passen zu Befunden, die Vertebraten Protein-Protein Interaktionen von Ndg untersuchten und die Interaktion über diese Domäne mit Laminin nachweisen konnten. Da von Ndg keine Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren bekannt ist, scheint die Inkorporation in die BI über Laminine realisiert zu werden. Des Weiteren zeigt diese Studie, dass sowohl die erste wie auch die zweite globuläre Domäne miteinander partiell redundant die Funktion der Interaktion mit Kollagen ermöglichen (Dai et al. 2018). Mutantanalysen zeigen darüber hinaus die Abhängigkeit der Ndg Lokalisation in die BI von der korrekten Expression der Laminin-Untereinheiten LanA (Wolfstetter et al. 2019) und LanB1 (Dai et al. 2019, Wolfstetter et al. 2018). Zusammen mit der hohen Konservierung dieser Domänen unterstützen diese Daten die Bindung von Ndg an das Laminin- wie auch das Kollagen-Netzwerk.

Die Expressionsanalyse der vorliegenden Arbeit zeigt starke mRNA Expression von *Ndg* in den mesodermalen Geweben, der viszeralen und somatischen Muskulatur sowie in den Kappenzellen (*cap cells*) der Chordotonalorgane. Es konnte allerdings keine Expression in embryonalen Hämocyten und im Fettkörper detektiert werden, die für die meisten ECM Proteine und im speziellen für Laminin und Kollagen IV die höchsten Expressionslevel aufweisen und für andere Gewebe sekretieren (Kusche-Gullberg et al., 1992; Martinek et al., 2008; Matsubayashi et al., 2017; Le Parco et al., 1986; Urbano et al., 2009; Wolfstetter and Holz, 2012). Detailliertere Expressionsanalysen wurden in Wolfstetter et al. (2019) durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit anschließender Verstärkung der mRNA mittels Detektion durch Tyramid Signal Amplifikation gezeigt. Die frühe embryonale mRNA Verteilung wurde in einzelnen Zellen des gnathalen Kopfsegments im Kopfbereich, einzelnen Zellen des dorsalen Mesoderms und Expression in der Amnioserosa gezeigt. Dagegen konnte die Proteinverteilung in allen Basallaminae im *Drosophila* Embryo detektiert werden. Im Kontext der nicht vorhandenen Expression

in Hämocyten und im Fettkörper deuten diese vergleichenden Expressionsmuster des Proteins und der mRNA auf bisher unentdeckte Sekretionsmechanismen hin. Die Befunde der immunhistochemischen Lokalisation der *Ndg* mRNA werden durch die Expressionsmuster von Ndg-GFP Reporterkonstrukten unterstützt (Dahlitz, 2011). Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit durch *in situ* Hybridisierung sowie der weiteren durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung detektierten Expressionsmuster (Wolfstetter et al., 2019) postulieren Dai et al. (2018) *Ndg* Expression in Hämocyten und Fettkörper. Dieser Widerspruch muss zum weiteren Verständnis der Rolle von *Ndg* und dessen Sekretionsmechanismen mit weiteren Experimenten geklärt werden. Aufklärung könnte ektopische Fehlexpression von Ndg oder RNA-seq Analysen bringen.

Die hohe Konservierung von Ndg über die Metazoen hinweg und die damit verbundene Lokalisation von Ndg in allen Bl, suggeriert eine essentielle Rolle für die Entwicklung von Organismen. Die mutanten Allele *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* und *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* wurden in dieser Arbeit auf die verbleibende Proteinmenge analysiert und quantifiziert. In Wolfstetter et al. (2019) wurde bereits gezeigt, dass es sich bei *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* um ein hypomorphes Allel handelt, da noch Reste des Proteins zu detektieren sind. Durch *in situ* Hybridisierung konnte kein spezifisches Signal in diesen Mutanten detektiert werden, was auf eine nicht ausreichende Sensitivität dieser Detektionsmethode hindeutet. Da *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* keine Proteinexpression mehr zeigt und aufgrund der Tatsache, dass der komplette genomische Bereich um den Transkriptionsstartpunkt deletiert wurde, muss es sich um ein amorphes Allel handeln (Wolfstetter et al., 2019). Die Quantifizierung des durch Antikörperfärbung detektierten Fluoreszenzsignals von Ndg zeigt im Mittelwert das höchste Signal in den Kontrolltieren von *Ndg<sup>Δ0.4</sup>/CyO* und ein vergleichsweise schwächeres Signal in den Kontrolltieren *Ndg<sup>Δ1.4</sup>/CyO* und *Df Ndg/CyO*. Der Mittelwert von homozygoten *Ndg<sup>Δ0.4</sup>* ist dabei signifikant höher, als in den Kompletterlustsituationen von *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* und *Df Ndg*. Dabei sind die Restwerte in den Ansätzen der Kompletterluste auf unspezifische Signale des Antikörpers in der Epidermis zurückzuführen. Die Western Blot Analyse, welche die Proteinmenge in dritten Larven darstellt, zeigt vergleichbare Ergebnisse. Hier konnte das stärkste Signal in Kontrolltieren nachgewiesen werden, das bei *Ndg<sup>Δ0.4</sup>/CyO* stärker ausfällt als bei *Ndg<sup>Δ1.4</sup>/CyO*. Im Ansatz von homozygoten *Ndg<sup>Δ1.4</sup>* Larven konnte kein Ndg Signal detektiert werden. Die Unterschiede in den heterozygoten Kontrolltieren der embryonalen und larvalen Analysen könnten auf die dosisabhängige Expression dieser *Ndg* Allele zurückzuführen sein. Zu der anzunehmenden wildtypischen Expression der Balancer Chromosomen kommt die Restexpression der *Ndg* Allele hinzu, welche im Vergleich zu der alleinigen Expression des Balancer Chromosoms leicht erhöht ist. Dieser Dosiseffekt wurde bereits durch funktionelle Analysen von Wolfstetter et al. (2019) bestätigt.

Die Untersuchungen der Komposition der Bl im amorphen *Ndg* mutanten Hintergrund, zeigten keine Veränderung der analysierten Proteine. Die postulierte Rolle von Ndg für die Zusammensetzung und Verlinkung des Laminin- und Kollagen-Netzwerk konnte damit widerlegt werden. Die vorangegangenen Experimente zeigten bereits, dass *Ndg* im Gegensatz zu anderen ECM Komponenten keine Rolle für die Embryonalentwicklung spielt, die Letalität zur Folge hätte. Auch Analysen mit Markern, welche die Morphologie der inneren Organe darstellen, zeigten keine Unregelmäßigkeiten bei Ndg Verlust. Die hohe Konservierung von Ndg über das Tierreich suggeriert eine entscheidende Rolle für die Entwicklung.

#### 6.4. *Nidogen* Mutanten zeigen eine verminderte Fertilität

In weiteren Experimenten konnte eine verminderte Fertilität von *Ndg* Tieren sowohl in Weibchen wie auch in Männchen gezeigt werden. Die Anzahl der nicht befruchteten Eier stieg mit steigendem Alter der Weibchen und ältere *Ndg* Männchen waren öfter steril oder befruchteten die zugegebenen Weibchen nicht. In Testes konnten nach morphologischen Analysen keine Defekte in der *Ndg* Verlustsituation identifiziert werden. Im Ovar wurde zwar Kollagen IV wie auch in allen anderen untersuchten Geweben unverändert lokalisiert, die Größe des Gewebes war allerdings vermindert. Dieser Effekt kann mit einer verringerten Anzahl an Oozyten in Zusammenhang gebracht werden. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Anzahl frühzeitig apoptotischer Kerne mit steigendem Alter der Weibchen im Ovar von *Ndg* Mutanten detektiert werden. Diese Befunde könnten auf eine Störung der Homöostase der Stammzellnischen dieser Gewebe hinweisen. ECM Komponenten spielen dabei in Testes und im Ovar in der Positionierung der Stammzellnische und damit für die Aufrechterhaltung weiterer Differenzierungsprozesse eine essentielle Rolle (van de Bor et al., 2015; Papagiannouli et al., 2014; Pearson et al., 2016; Tanentzapf et al., 2007). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte die geringere Belastbarkeit dieser Gewebe sein. In der viszeralen Muskulatur und weiteren Geweben kommt es bei *Ndg* Verlust zu Löchern in der BI (Wolfstetter et al., 2019), die auch im Testes und im Besonderen im Ovar auftreten könnten, da gerade das Ovar im Zuge der permanenten Produktion von Oozyten unter starker physikalischer Belastung steht. Solche immensen Störungen der BI könnten dann in messbaren physiologischen Defekten münden.

Der funktionelle Verlust von jeweils einem der beiden *Ndg* Genen in Mäusen resultiert weder in Letalität noch kommt es zu einer Störung der BI Formierung. Allerdings zeigen *Ndg1* mutante Tiere neurologische Phänotypen, wie spontane Anfälle und einen Kontrollverlust der Hinterbeine (Dong et al., 2002; Murshed et al., 2000; Schymeinsky et al., 2002). Bei Doppelmutanten kommt es zwar ebenso wenig zu embryonaler Letalität und auch hier ist die Formierung der BI nicht gestört, allerdings findet sich perinatale Letalität, weil die Herz- und Lungenentwicklung durch fehlerhaft assoziierte ECM gestört ist (Bader et al., 2005; Böse et al., 2006). Analysen von *nid-1* Mutanten in *C. elegans* sind auch vital und fertil und zeigen keine Auffälligkeiten im Aufbau der BI. Die Fertilität ist allerdings reduziert. Die Tiere weisen Störungen im Bewegungsablauf auf und die Orientierung der longitudinalen Nerven sowie die Anordnung der neuromuskulären Verbindungen sind gestört (Ackley et al., 2003; Hobert and Bülow, 2003; Kang and Kramer, 2000; Kim and Wadsworth, 2000). Schließlich kommt es bei Verlust von *nid1a* in *Danio* zu einer Reduktion der Körperlänge (Zhu et al., 2017). Die Analysen von *Ndg* in *Drosophila* deckten vergleichbare Ergebnisse auf. Neurologische Defekte wie Bewegungs- und Orientierungsstörungen konnten mit Defekten bei der Innervierung im PNS und fehlerhafter Anordnung von Cilien in Neuronen erklärt werden. Darüber hinaus konnte eine Rolle von *Ndg* für die Stabilität und Abdichtung der ECM gezeigt werden. Die daraus resultierende Rolle von *Ndg* liegt damit in der Barrierefunktion und in der Stärkung der ECM (Wolfstetter et al., 2019).

Die konservierte Funktion in der Innervierung von Muskeln könnte sich auch auf das Paarungsverhalten von *Ndg* mutanten Männchen auswirken, da fehlerhafte Innervierungen auch paarungsrelevante Verhaltensweisen wie den *courtship song* beeinflussen, weil die Innervierung der Flugmuskulatur ein entscheidender Aspekt für diesen Prozess ist (von Philipsborn et al., 2011; Shirangi et al., 2013; Stockinger et al., 2005; Trimarchi and Schneiderman, 1994). Dabei könnten die Rolle von *Ndg* für die Stabilität der ECM und die neurologischen Befunde dieselbe Ursache haben. Die fehlende Stabilität der ECM äußert sich auch im Nervensystem in Form von fehlender Innervierung und

falsch angeordneten Cilien (Wolfstetter et al., 2019). Die Steifheit der ECM spielt auch bei der Differenzierung von Geweben, wie beispielsweise dem Auswachsen von Nerven, eine entscheidende Rolle. Bei Verlust von Pericardin, einem Typ Kollagen IV Protein, kommt es zu einem gestörten Auswachsen von Nerven, was auf die erhöhte mechanische Belastung zurückzuführen ist, die durch die gestörte ECM nicht ausreichend kompensiert werden kann (Salzberg, 2019). Die resultierenden Phänotypen mit neurologischen Störungen sind äquivalent zu den Phänotypen, die in *Ndg* beobachtet wurden (Wolfstetter et al., 2019).

Darüber hinaus konnte durch ultrastrukturelle Analysen eine durchlöcherterte ECM nachgewiesen werden, die im Besonderen unter Spannung in starken Phänotypen resultierte. Defekte, die sich sowohl auf die Physiologie von Testes und Ovar auswirken und die Fertilität stören könnten. Die Defekte im Ovar könnten auf mechanischen Stress, dem die ECM ohne *Ndg* möglicherweise nicht ausreichend standhalten kann, zurückzuführen sein. Da die Steifheit von ECM neben der Migration auch den Erhalt der Homöostase von Geweben und die Differenzierung von Stammzellen beeinflusst (Handorf et al., 2015), bedarf es umfassender Analysen, um die Defekte in Bezug auf die verringerte Fertilität zu erklären. Darüber hinaus ist *Drosophila Ndg* aufgrund seiner Vitalität ein gut geeignetes Modell, um die mechanischen Funktionen von ECM *in vivo* zu untersuchen. Die Rolle von *Ndg* liegt in der Barrierefunktion, der Stabilität der ECM und der Fertilität. Allesamt Aspekte, die Fitness beeinflussen, aber nicht die generelle Assemblierung von ECM Komponenten.

## 6.5. Spezifische Rollen von *Mmps*

Die Remodellierung von ECM-Komponenten ist ein essentieller Bestandteil von Differenzierungsprozessen. Während der Metamorphose werden die meisten Gewebe abgebaut und durch Stammzellen neu aufgebaut.

Der Verlust jeder der beiden *Mmps* resultiert in Letalität (Page-McCaw et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die meisten Tiere dabei in den Larvalphasen starben. Während nach Kompletterverlust von *Mmp1* keine Tiere die Puppenphase erreichten, gab es nach *Mmp2* Verlust lediglich einen geringen Prozentsatz verpuppter Larven. Dabei könnte eine entscheidende Rolle der *Mmps* in einer Funktion während der Larvalhäutungen liegen, da verstorbene Tiere sich zumeist in der initialen Phase der Häutung befanden und darin festzustecken schienen. Für die korrekte Entwicklung muss die apikale ECM der Epidermis remodelliert werden, um die alte Kutikula durch eine neue zu ersetzen. In diesem Prozess ist bisher keine Rolle von *Mmps* bekannt und lediglich die Rolle von essentiellen Chitinasen in Insekten ist dafür beschrieben (Arakane and Muthukrishnan, 2010; Chaudhari et al., 2011; Merzendorfer and Zimoch, 2003). Eine andere oder möglicherweise zusätzliche Rolle könnte die fehlende Remodellierung der ECM in Tracheen sein. Hierzu konnte eine Rolle von *Mmp1* für das korrekte Auswachsen der Tracheenäste gezeigt werden (Glasheen et al., 2010).

Die Analyse der Proteinverteilung während der Metamorphose zeigt den Abbau der ECM um die somatische und viszerale Muskulatur zwischen den Stadien P3 und P6 und den anschließenden Wiederaufbau zwischen P6 und P12. Die Analyse der Proteinlokalisierung von *Mmp1* zeigt die hauptsächliche Verteilung im Fettkörper und zusätzlich auf histolysierten Materialien. Die Proteinverteilung von *Mmp2* dagegen konnte neben einer Expression am Fettkörper, auch an den Membranen der viszeralen und somatischen Muskulatur detektiert werden, während dort die ECM abgebaut wurde. Die zusätzlichen Daten der Expressionsanalyse deuten auf eine *Mmp1* Expression,

die im Wesentlichen in den sekretierenden Geweben Fettkörper und Hämozyten stattfindet und darüber hinaus auch schwache Expression im larvalen und/oder pupalen Mitteldarmepithel zeigt. *Mmp2* ist dagegen in Membrannähe von Geweben exprimiert und auch dort lokalisiert, während die ECM abgebaut wird. Es konnte kein Expressionssignal von *Mmp2* in Hämozyten gefunden werden. Diese Zusammenhänge deuten auf eine Rolle von *Mmp1*, die sich hauptsächlich im Hämocoel abspielt, und einer Rolle von *Mmp2* an der Membran. Diese Expressionsorte weisen auf spezifische und nicht redundante Funktionen der beiden *Mmps* hin.

Analysen der Funktion beider *Mmps* während der Metamorphose konnten bisher im dissoziierenden Fettkörper gezeigt werden. Nach Knockdown eines der beiden Gene kam es zu einer verminderten Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen und damit dem Zusammenhalt dieses Gewebes (Jia et al., 2014). Analysen der wenigen homozygoten *Mmp2<sup>lacZ</sup>* Tiere zeigten ein Ausbleiben der Degradierung von larvalen Geweben und das Auftreten von apoptotischem Zellmaterial am Darm. Dieses stark melanisierte Kompartiment wurde bereits in Page-McCaw et al., 2003 als „Schwarzer Klumpen“ charakterisiert, der in den meisten allelischen Kombinationen auftritt, allerdings auch nicht weiter beschrieben wurde. Der Knockdown von *Mmp2* während der Metamorphose führt ebenfalls zu solchen phänotypischen Defekten und deshalb in allen Tieren zur Letalität. Um die spezifische Rolle von *Mmp2* für die Remodellierung von Geweben zu verstehen, die nicht von *Mmp1* kompensiert werden können, wurde der Mitteldarm auf Defekte untersucht. In der wildtypischen Situation wird der kontraktile Apparat der viszeralen Muskulatur abgebaut und die Muskeln dedifferenzieren zu ein- bis drei-kernigen Myoblasten (Aghajanian et al., 2016; Klapper et al., 2001). Das larvale Mitteldarmepithel löst sich von der Muskulatur, wird von den proliferierenden Mitteldarm-Stammzellen verdrängt und von einer Subpopulation dieser Zellen eingeschlossen und inkorporiert (Lee et al., 2002; Takashima et al., 2011). Die Analyse des *Mmp2*-Knockdowns durch Färbung von F-Actin zeigte, dass der kontraktile Apparat der viszeralen Muskulatur vorhanden bleibt und die Muskeln nicht dedifferenzieren. Es scheint zwar zu initialen Kontraktionsbewegungen zu kommen, die Länge der longitudinalen Muskeln ist allerdings mit der wildtypischen Situation des Puppenstadiums 3 vergleichbar. In Bezug auf das Mitteldarmepithel konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. Das larvale Mitteldarmepithel löst sich zwar scheinbar von der Muskulatur und wird etwas kompakter, allerdings blieben weitere Degradationsprozesse aus. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die für die Anwesenheit einer Bl essentiellen Komponenten LanA, LanB1 und Perlecan bei Knockdown von *Mmp2* nicht abgebaut werden. Die Degradierung von ECM Komponenten scheint also eine entscheidende Rolle in der Morphogenese während der Remodellierung des Mitteldarms zu spielen. Die initiale Lösung des larvalen Mitteldarms könnte durch die proliferierenden adulten Mitteldarm Vorläuferzellen erklärt werden, die bereits in der späten dritten Larvalphase innerhalb der Bl anfangen sich zu teilen (Skaer, 1993) und sich zwischen viszeraler Muskulatur und larvalen Mitteldarm ausbreiten müssen. Zusätzlich scheint *Mmp1* in der Histolyse des larvalen Mitteldarms eine Rolle zu spielen. Die Proteinlokalisierung in Zellen des larvalen und transienten pupalen Mitteldarms deutet auf eine Rolle der Prozessierung von Zellkompartimenten auch nach dem Abbau der Bl. Eine potentielle Rolle könnte in der Auflösung von Zell-Zell-Verankerungen liegen, die eine Lockerung und Verdichtung des Gewebes ermöglichen würde und die initiale Kondensierung erklären kann, die nach *Mmp2* Knockdown beobachtet wurde. Interessanterweise scheint die viszerale Muskulatur in ihrer Entwicklung nach Verlust von *Mmp2* im Stadium P3 festzustecken. Die nicht abgebaute ECM verhindert also die Dedifferenzierung dieser Zellen. Die für diese Dedifferenzierung

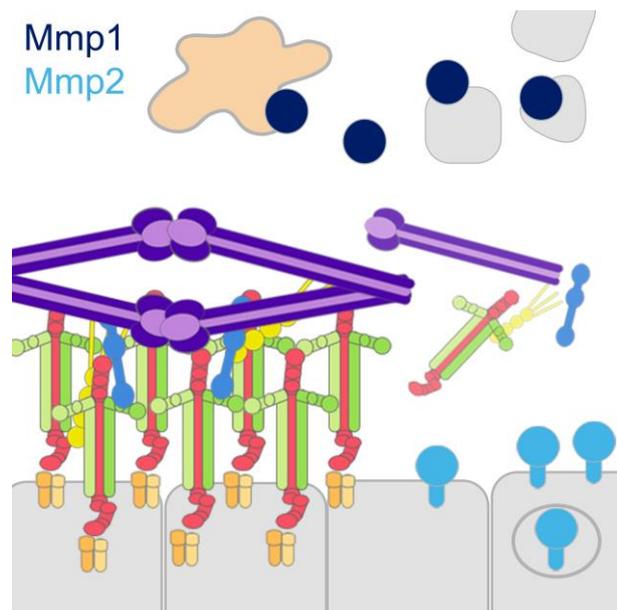
der Myoblasten benötigten Signalwege scheinen in dieser Fehlfunktion allerdings auch keinen Schaden zu verursachen oder aber sie werden erst durch den Abbau der ECM initiiert.

Der fehlende Abbau von ECM-Komponenten nach *Mmp2*-RNAi bringt zudem Erkenntnisse über die Rollen der beiden *Mmps* in *Drosophila* mit sich. *Mmp1* kann den Verlust von *Mmp2* in Bezug auf ECM Remodellierung nicht kompensieren. Die untersuchten Komponenten waren scheinbar unverändert vorhanden. Diese Befunde suggerieren, dass *Mmp1* keine grundlegende Rolle im Abbau der BI spielt. Studien die sich mit unterschiedlichen Rollen der beiden *Mmps* befassten, zeigten bereits, dass es abweichende Rollen in Bezug auf die Substratspezifität gibt. Dabei konnte eine Rolle von *Mmp1* für die Degradierung von DE-Cadherin im Fettkörper gezeigt werden, während *Mmp2* zu größerem Anteil die BI prozessiert (Bond et al., 2011; Jia et al., 2014). Ähnliche Ergebnisse konnten für die Herzentwicklung in *Drosophila* erzielt werden. Während *Mmp1* dort die Fläche der über E-Cadherin vermittelten Zellkontakte bestimmt, ist *Mmp2* für die Expansion der BI assoziierten Basalseite verantwortlich (Raza et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Komposition der ECM in der Verlustsituation einer der beiden *Mmps* analysiert. Neben den analysierten Komponenten könnte auch der Abbau von Kollagen IV von *Mmp2* realisiert werden, da die Lokalisation von Perlecan von dessen Anwesenheit abzuhängen scheint (Matsubayashi et al., 2017; Pastor-Pareja and Xu, 2011). Allerdings gibt es Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass Kollagen IV durch *Mmp1* degradiert wird (Katsuyama et al., 2017). Aufgrund der Verteilung von *Mmp1* im Hämocoel könnte die äußere Schicht der BI, insbesondere Kollagen IV, von außen durch *Mmp1* und von innen durch das membranständige *Mmp2* degradiert werden. Ein Aspekt, der zum Verständnis der Rolle von *Mmps* und zur Vervollständigung dieser Analysen noch untersucht werden sollte.

Analysen im Ovar haben darüber hinaus eine Rolle von *Mmp2* als Antagonist des Wnt-Signalweges aufgedeckt, der für die räumliche Positionierung der Stammzellnische essentiell ist. In der *Mmp2* Verlustsituation kommt es zur Störung der Proliferation von Follikelzellen und schwache Allele zeigten eine reduzierte Fertilität (Wang and Page-McCaw, 2014). In einer weiteren Studie konnte die Rolle von *Mmp2* für die Ovulation gezeigt werden, bei der *Mmp2* die ECM des Follikelepithels degradiert (Deady et al., 2015). Ein Mechanismus, der eine distinkte Degradierung von ECM Proteinen voraussetzt. Besonders interessant sind diese Befunde im Zusammenhang mit den hier gezeigten Phänotypen von *Ndg* im Ovar, da Änderungen der ECM in Störungen dieser Mechanismen resultieren könnten und so den Verlust an Fertilität von *Ndg* erklären würden. Zusätzlich zeigen diese Studien, dass lediglich *Mmp2* und nicht *Mmp1* für die Homöostase dieser Gewebe in Bezug auf die ECM Prozessierung verantwortlich ist. Ein Aspekt, der mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten in Einklang steht und eine spezifische Rolle von *Mmp2* für die Prozessierung von ECM Proteinen postulieren lässt, während *Mmp1* möglicherweise dabei keine direkte Rolle zuzuordnen ist.

Im Kontext der Enhanceraktivität der getesteten *lacZ*-Linien und der Proteinlokalisierung könnte *Mmp1* zwar in einigen Geweben auch membrangebunden vorliegen, wird aber vermehrt durch den Fettkörper und die Hämocyten in den extrazellulären Raum sekretiert. Die Verteilung und Expression von *Mmp2* deuten hingegen auf eine Lokalisation an die Membran hin. Grundsätzlich werden *Mmps* in membrangebundene und sekretierte Typen unterschieden (Page-McCaw et al., 2007; Sternlicht and Werb, 2001). Aus Zellkulturversuchen wurde geschlossen, dass beide in *Drosophila* existenten *Mmps* beide Typen repräsentieren, da transfizierte Zellen jeweils ein Signal beider *Mmps* sowohl an der Membran wie auch im Medium zeigten (LaFever et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf ein verstärktes Vorkommen von *Mmp1* als sekretiertem Protein und möglicherweise eine zusätzliche

membranverankerte Form und ein nur membranassoziertes Mmp2. Zusammen genommen Ergebnisse, die sich mit Befunden aus anderen *in vivo* Studien decken (Llano et al., 2002; Page-McCaw et al., 2003; Stevens and Page-McCaw, 2012).



**Abbildung 29: Rolle der Mmps für den Abbau der ECM und die Remodellierung von Geweben.** Mmp2 (hellblau) wird gewebe-spezifisch von Zellen exprimiert, in denen ECM abgebaut werden muss. Mmp1 dagegen wird von Hämocyten exprimiert und in das Hämocoel sekretiert. Dort gelangt es an Zellreste und degradiert möglicherweise Zell-Zell-Kontakte.

Damit ergibt sich ein Bild für die Rolle von Mmps während der Metamorphose, in dem *Mmp2* gewebespezifisch exprimiert wird und über eine membranassoziierte Lokalisation die BI abbaut, und *Mmp1* nur in Geweben exprimiert wird, die nicht über das Hämocoel erreichbar sind, um dort Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Das massenhaft autophagische Material, welches nach Abbau der ECM und Initiierung der Abbauprozesse in das Hämocoel abgegeben wird, kann anschließend durch die starke extrazellulär lokalisierte Proteinverteilung von Mmp1 weiter degradiert werden.

## 7. 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*, 623–633.
- Ackley, B.D., Kang, S.H., Crew, J.R., Suh, C., Jin, Y., and Kramer, J.M. (2003). The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* *23*, 3577–3587.
- Aghajanian, P., Takashima, S., Paul, M., Younossi-Hartenstein, A., and Hartenstein, V. (2016). Metamorphosis of the *Drosophila* visceral musculature and its role in intestinal morphogenesis and stem cell formation. *Dev. Biol.*
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila*. A laboratory handbook. Dros. A Lab. Handbook.
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* *38*, W529-33.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* *44*, W344-50.
- Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K., and Timpl, R. (1989). Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* *184*, 241–248.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., and Fox, J.W. (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int.* *43*, 7–12.
- Bader, B.L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkaapati, S., Murshed, M., and Nischt, R. (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6846–6856.
- Barolo, S., Carver, L.A., and Posakony, J.W. (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* *29*, 726, 728, 730, 732.
- Bastiani, M.J., Harrelson, A.L., Snow, P.M., and Goodman, C.S. (1987). Expression of *fasciclin I* and *II* glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. *Cell* *48*, 745–755.
- Berger, S., Schäfer, G., Kesper, D.A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R.H., Beck, L., Klämbt, C., Renkawitz-Pohl, R., and Onel, S.-F. (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J. Cell Sci.* *121*, 1303–1313.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513–1523.
- Bischoff, M.C. (2016). Die transkriptionelle Regulation von *Laminin B2* während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bond, N.D., Nelliott, A., Bernardo, M.K., Ayerh, M.A., Gorski, K.A., Hoshizaki, D.K., and Woodard, C.T. (2011).  $\beta$ FTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *360*, 286–296.

- Bonn, S., Zinzen, R.P., Girardot, C., Gustafson, E.H., Perez-Gonzalez, A., Delhomme, N., Ghavi-Helm, Y., Wilczyński, B., Riddell, A., and Furlong, E.E.M. (2012). Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. *Nat. Genet.* *44*, 148–156.
- van de Bor, V., Zimniak, G., Papone, L., Cerezo, D., Malbouyres, M., Juan, T., Ruggiero, F., and Noselli, S. (2015). Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Rep.* *13*, 546–560.
- Borchiellini, C., Coulon, J., and Le Parco, Y. (1996). The function of type IV collagen during *Drosophila* muscle development. *Mech. Dev.* *58*, 179–191.
- Böse, K., Nischt, R., Page, A., Bader, B.L., Paulsson, M., and Smyth, N. (2006). Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *J. Biol. Chem.* *281*, 39620–39629.
- Boyle, A.P., Araya, C.L., Brdlik, C., Cayting, P., Cheng, C., Cheng, Y., Gardner, K., Hillier, L.W., Janette, J., Jiang, L., et al. (2014). Comparative analysis of regulatory information and circuits across distant species. *Nature* *512*, 453–456.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401–415.
- Campbell, K., Whissell, G., Franch-Marro, X., Batlle, E., and Casanova, J. (2011). Specific GATA Factors Act as Conserved Inducers of an Endodermal-EMT. *Dev. Cell* *21*, 1051–1061.
- Capo-chichi, C.D., Roland, I.H., Vanderveer, L., Bao, R., Yamagata, T., Hirai, H., Cohen, C., Hamilton, T.C., Godwin, A.K., and Xu, X.-X. (2003). Anomalous expression of epithelial differentiation-determining GATA factors in ovarian tumorigenesis. *Cancer Res.* *63*, 4967–4977.
- Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B., and Chung, A.E. (1981). Entactin, a Novel Basal Lamina-associated Sulfated Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* *256*, 5209–5214.
- Cavaliere, V., Taddei, C., and Gargiulo, G. (1998). Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* *208*, 106–112.
- Celniker, G., Nimrod, G., Ashkenazy, H., Glaser, F., Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2013). ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function. *Isr. J. Chem.* *53*, 199–206.
- Cognato, H., and Yurchenco, P.D. (2000). Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* *218*, 213–234.
- Cooley, L., Kelley, R., and Spradling, A. (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* *239*, 1121–1128.
- Dahlitz, I. (2011). Die morphologische und molekulare Charakterisierung des extrazellulären Matrixproteins Nidogen bei *Drosophila*. Justus-Liebig Universität Gießen.
- Dai, J., Estrada, B., Jacobs, S., Sánchez-Sánchez, B.J., Tang, J., Ma, M., Magadán-Corpas, P., Pastor-Pareja, J.C., and Martín-Bermudo, M.D. (2018). Dissection of Nidogen function in *Drosophila* reveals tissue-specific mechanisms of basement membrane assembly. *PLOS Genet.* *14*, e1007483.
- Datta, S., and Kankel, D.R. (1992). *l(1)trol* and *l(1)devl*, loci affecting the development of the adult central nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *130*, 523–537.

- Deady, L.D., Shen, W., Mosure, S.A., Spradling, A.C., and Sun, J. (2015). Matrix Metalloproteinase 2 Is Required for Ovulation and Corpus Luteum Formation in *Drosophila*. *PLOS Genet.* 11, e1004989.
- Deng, W.M., and Ruohola-Baker, H. (2000). Laminin A is required for follicle cell-oocyte signaling that leads to establishment of the anterior-posterior axis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 683–686.
- Dong, L., Chen, Y., Lewis, M., Hsieh, J.-C., Reing, J., Chaillet, J.R., Howell, C.Y., Melhem, M., Inoue, S., Kuszak, J.R., et al. (2002). Neurologic Defects and Selective Disruption of Basement Membranes in Mice Lacking Entactin-1/Nidogen-1. *Lab. Investig.* 82, 1617–1630.
- Durkin, M., Chakravarti, S., Bartos, B., Liu, S., Friedman, R., and Chung, A. (1988a). Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor. *J. Cell Biol.* 107, 2749–2756.
- Durkin, M.E., Bartos, B.B., Liu, S.H., Phillips, S.L., and Chung, A.E. (1988b). Primary structure of the mouse laminin B2 chain and comparison with laminin B1. *Biochemistry* 27, 5198–5204.
- Engel, J., and Chiquet, M. (2011). An Overview of Extracellular Matrix Structure and Function. In *The Extracellular Matrix: An Overview*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–39.
- Fox, J.W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J., et al. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* 10, 3137–3146.
- Frank, L.H., and Rushlow, C. (1996). A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development* 122, 1343 LP-1352.
- Friedrich, M.V.K., Schneider, M., Timpl, R., and Baumgartner, S. (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* 267, 3149–3159.
- Fujikura, J., Yamato, E., Yonemura, S., Hosoda, K., Masui, S., Nakao, K., Miyazaki Ji, J., and Niwa, H. (2002). Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 16, 784–789.
- Futaki, S., Hayashi, Y., Emoto, T., Weber, C.N., and Sekiguchi, K. (2004). Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating *Gata-4* and *Gata-6* expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10492–10503.
- Garcia-Alonso, L., Fetter, R.D., and Goodman, C.S. (1996). Genetic analysis of Laminin A in *Drosophila*: extracellular matrix containing laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* 122.
- Ghavi-Helm, Y., Zhao, B., and Furlong, E.E.M. (2016). Chromatin Immunoprecipitation for Analyzing Transcription Factor Binding and Histone Modifications in *Drosophila*. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), pp. 263–277.
- Glasheen, B.M., Robbins, R.M., Piette, C., Beitel, G.J., and Page-McCaw, A. (2010). A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 344, 772–783.
- Gupta, M.C., Graham, P.L., and Kramer, J.M. (1997). Characterization of  $\alpha 1$ (IV) Collagen Mutations in *Caenorhabditis elegans* and the Effects of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ (IV) Mutations on Type IV Collagen Distribution. *J. Cell Biol.* 137, 1185–1196.
- Gutzeit, H.O., Eberhardt, W., and Gratwohl, E. (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J. Cell Sci.* 100.

- Haas, C.S., Gleason, B., Lin, S., Tramonti, G., and Kanwar, Y.S. (2004). Matrix Metalloproteinases in Renal Development. *Connect. Tissue Res.* *45*, 73–85.
- Hamp, J., Löwer, A., Dottermusch-Heidel, C., Beck, L., Moussian, B., Flötenmeyer, M., and Önel, S.-F. (2016). *Drosophila* Kette coordinates myoblast junction dissolution and the ratio of Scar-to-WASp during myoblast fusion. *J. Cell Sci.* *129*, 3426–3436.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.
- Handorf, A.M., Zhou, Y., Halanski, M.A., and Li, W.-J. (2015). Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis* *11*, 1–15.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* *418*, 244–251.
- Hartenstein, V. (1993). *Atlas of Drosophila development*. (Cold Spring Harbor (New York): CSH Press).
- Hauptmann, G., Söll, I., Krautz, R., and Theopold, U. (2016). Multi-target Chromogenic Whole-mount In Situ Hybridization for Comparing Gene Expression Domains in *Drosophila* Embryos. *J. Vis. Exp.* e53830.
- Heitzler, P., Haenlin, M., Romain, P., Calleja, M., and Simpson, P. (1996). A genetic analysis of pannier, a gene necessary for viability of dorsal tissues and bristle positioning in *Drosophila*. *Genetics* *143*, 1271–1286.
- 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 LP-337.
- Ho, M.S.P., Böse, K., Mokkaapati, S., Nischt, R., and Smyth, N. (2008). Nidogens—Extracellular matrix linker molecules. *Microsc. Res. Tech.* *71*, 387–395.
- Hobert, O., and Bülow, H. (2003). Development and maintenance of neuronal architecture at the ventral midline of *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 70–78.
- Hof, S., and Bökel, C. (2019). Cell Competition and Immunity Signaling in the *Drosophila* Testis Niche. In Joint Meeting of the German and Israeli Societies of Developmental Biology, GFE.
- Hohenester, E., and Yurchenco, P.D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh. Migr.* *7*, 56–63.
- Holton, T.A., and Graham, M.W. (1991). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.* *19*, 1156–1156.
- Hopf, M., Göhring, W., Mann, K., and Timpl, R. (2001). Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan. *J. Mol. Biol.* *311*, 529–541.
- 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*, 577–580.
- Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 802–812.
- Hynes, R.O. (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* (80-. ). *326*, 1216–1219.
- Hynes, R.O. (2012). The evolution of metazoan extracellular matrix. *J. Cell Biol.* *196*, 671–679.

- Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a004903.
- Ichihara, Y., and Kurosawa, Y. (1993). Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products. *Gene* *130*, 153–154.
- Jia, Q., Liu, Y., Liu, H., Li, S., Yap, A.S., Crampton, M.S., Hardin, J., Uemura, T., Oda, H., Hayashi, S., et al. (2014). Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles. *Sci. Rep.* *4*, 7535.
- Kaipa, B.R., Shao, H., Schäfer, G., Trinkewitz, T., Groth, V., Liu, J., Beck, L., Bogdan, S., Abmayr, S.M., and Önel, S.-F. (2013). Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts. *J. Cell Sci.* *126*, 360–372.
- Kang, S.H., and Kramer, J.M. (2000). Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* *11*, 3911–3923.
- Karthikeyan, V.J., Lane, D.A., Beevers, D.G., Lip, G.Y.H., and Blann, A.D. (2013). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in hypertension-related pregnancy complications. *J. Hum. Hypertens.* *27*, 72–78.
- Katsuyama, T., Kashio, S., Zhou, M., and Miura, M. (2017). A role of Nidogen in the reorganization of basement membranes during imaginal discs. In 25th European *Drosophila* Research Conference, EDRC.
- Kefalides, N.A., and Borel, J.P. (2005a). Internal Organization of Basement Membranes. *Curr. Top. Membr.* *56*, 265–285.
- Kefalides, N.A., and Borel, J.P. (2005b). Structural Macromolecules: Laminins, Entactin/Nidogen, and Proteoglycans (Perlecan, Agrin). *Curr. Top. Membr.* *56*, 147–197.
- Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J.A., Van Der Lee, R., Bessy, A., Chèneby, J., Kulkarni, S.R., Tan, G., et al. (2018). JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* *46*, D260–D266.
- Kim, S., and Wadsworth, W.G. (2000). Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by nidogen. *Science* *288*, 150–154.
- King, R.C. (1970). *Ovarian development in Drosophila melanogaster* (New York: Academic Press).
- Kirby, K.S. (1956). A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* *64*, 405–408.
- Klapper, R. (2000). The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech. Dev.* *95*, 47–54.
- Klein, T. (2008). *Immunolabeling of Imaginal Discs*. (Humana Press), pp. 253–263.
- Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* *23*, 1289–1291.
- Kumagai, T., Yokoyama, H., Goto, A., Hirose, J., Kadowaki, T., NARITA, H., and Kitagawa, Y. (2000). Screening for *Drosophila* Proteins with Distinct Expression Patterns during Development by use of Monoclonal Antibodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *64*, 24–28.

- 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*, 4519–4527.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- LaFever, K.S., Wang, X., Page-McCaw, P., Bhave, G., and Page-McCaw, A. (2017). Both *Drosophila* matrix metalloproteinases have released and membrane-tethered forms but have different substrates. *Sci. Rep.* *7*, 44560.
- Lécuyer, E., Parthasarathy, N., and Krause, H.M. (2008). Fluorescent *In Situ* Hybridization Protocols in *Drosophila* Embryos and Tissues. pp. 289–302.
- Legendre, F., Cody, N., Iampietro, C., Bergalet, J., Lefebvre, F.A., Moquin-Beaudry, G., Zhang, O., Wang, X., and Lécuyer, E. (2013). Whole mount RNA fluorescent *in situ* hybridization of *Drosophila* embryos. *J. Vis. Exp.* e50057.
- Leiss, D., Gasch, A., Mertz, R., and Renkawitz-Pohl, R. (1988).  $\beta$ 3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis. *Development* *104*, 525–531.
- Letunic, I., and Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* *46*, D493–D496.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* *40*, D302–5.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* *43*, D257–60.
- Lindsley, D.L., and Zimm, G.G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. (Elsevier Science).
- Llano, E., Adam, G., Pendás, A.M., Quesada, V., Sánchez, L.M., Santamariá, I., Noselli, S., and López-Otín, C. (2002). Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* *277*, 23321–23329.
- Mann, K., Deutzmann, R., Aumailley, M., Timpl, R., Raimondi, L., Yamada, Y., Pan, T.C., Conway, D., and Chu, M.L. (1989). Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* *8*, 65–72.
- 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*.
- Martin, G.R., Kleinman, H.K., Terranova, V.P., Ledbetter, S., and Hassell, J.R. (1984). The regulation of basement membrane formation and cell-matrix interactions by defined supramolecular complexes. *Ciba Found. Symp.* *108*, 197–212.
- 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*, 1671–1680.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., and Pospisek, M. (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.* *336*, 46–50.

- Matsubayashi, Y., Louani, A., Dragu, A., Sánchez-Sánchez, B.J., Serna-Morales, E., Yolland, L., Gyoergy, A., Vizcay, G., Fleck, R.A., Heddleston, J.M., et al. (2017). A Moving Source of Matrix Components Is Essential for De Novo Basement Membrane Formation. *Curr. Biol.* *27*, 3526–3534.e4.
- Mayer, U., Nischt, R., Pöschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y., and Timpl, R. (1993). A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J.* *12*, 1879–1885.
- Mayer, U., Zimmermann, K., Mann, K., Reinhardt, D., Timpl, R., and Nischt, R. (1995). Binding Properties and Protease Stability of Recombinant Human Nidogen. *Eur. J. Biochem.* *227*, 681–686.
- Mayer, U., Mann, K., Fessler, L.I., Fessler, J.H., and Timpl, R. (1997). *Drosophila* laminin binds to mammalian nidogen and to heparan sulfate proteoglycan. *Eur. J. Biochem.* *245*, 745–750.
- McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 534–540.
- McQuilton, P., St Pierre, S.E., Thurmond, J., and FlyBase Consortium, the F. (2012). FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* *40*, D706-14.
- Meyer, F., and Moussian, B. (2009). *Drosophila multiplexin (Dmp)* modulates motor axon pathfinding accuracy. *Dev. Growth Differ.* *51*, 483–498.
- Mirre, C., Cecchini, J.P., Le Parco, Y., and Knibiehler, B. (1988). De novo expression of a type IV collagen gene in *Drosophila* embryos is restricted to mesodermal derivatives and occurs at germ band shortening. *Development* *102*.
- Monson, J.M., Natzle, J., Friedman, J., and McCarthy, B.J. (1982). Expression and novel structure of a collagen gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 1761–1765.
- 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*, 463–473.
- 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*, 2441–2453.
- Moon, H., Filippova, G., Loukinov, D., Pugacheva, E., Chen, Q., Smith, S.T., Munhall, A., Grewe, B., Bartkuhn, M., Arnold, R., et al. (2005). CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep.* *6*, 165–170.
- 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*, 15050–15055.
- Muller, H.J. (1918). Genetic Variability, Twin Hybrids and Constant Hybrids, in a Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics* *3*, 422–499.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* *155*, 335–350.
- Murphy, G., and Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* *29*, 290–308.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M., and Nischt, R. (2000). The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7007–7012.

- Naba, A., Clauser, K.R., Ding, H., Whittaker, C.A., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* **49**, 10–24.
- Nagarkar-Jaiswal, S., Lee, P.P.-T., Campbell, M.E., Chen, K., Anguiano-Zarate, S., Gutierrez, M.C., Busby, T., Lin, W.-W., He, Y., Schulze, K.K.L., et al. (2015). A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in *Drosophila*. *Elife* **4**, 2743–2758.
- Natzle, J.E., Monson, J.M., and McCarthy, B.J. (1982). Cytogenetic location and expression of collagen-like genes in *Drosophila*. *Nature* **296**, 368–371.
- Nelson, C.R., and Szauter, P. (1992). Cytogenetic analysis of chromosome region 89A of *Drosophila melanogaster*: isolation of deficiencies and mapping of Po, Aldox-1 and transposon insertions. *Mol Gen Genet* **235**, 11–21.
- Ni, J.-Q., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L.-P., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L., and Perrimon, N. (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods* **5**, 49–51.
- Okumura, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., and Murakami, R. (2005). An endoderm-specific GATA factor gene, dGATAe, is required for the terminal differentiation of the *Drosophila* endoderm. *Dev. Biol.* **278**, 576–586.
- Okumura, T., Takeda, K., Kuchiki, M., Akaishi, M., Taniguchi, K., and Adachi-Yamada, T. (2016). GATAe regulates intestinal stem cell maintenance and differentiation in *Drosophila* adult midgut. *Dev. Biol.* **410**, 24–35.
- Olofsson, B., and Page, D.T. (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev. Biol.* **279**, 233–243.
- Page-McCaw, A. (2008). Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 14–23.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Santé, J.M., and Rubin, G.M. (2003). *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev. Cell* **4**, 95–106.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 221–233.
- Papagiannouli, F., Schardt, L., Grajcarek, J., Ha, N., and Lohmann, I. (2014). The Hox Gene Abd-B Controls Stem Cell Niche Function in the *Drosophila* Testis. *Dev. Cell* **28**, 189–202.
- Le Parco, Y., Knibiehler, B., Cecchini, J.P., and Mirre, C. (1986). Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during *Drosophila melanogaster* development. *Exp. Cell Res.* **163**, 405–412.
- Pastor-Pareja, J.C., and Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Dev. Cell* **21**, 245–256.
- 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**, 975–988.
- Paul Bainbridge, B.S., and Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Embryol. Exp. Morph* **66**, 57–80.
- Pearson, J.R., Zurita, F., Tomás-Gallardo, L., Díaz-Torres, A., Díaz de la Loza, M. del C., Franze, K., Martín-Bermudo, M.D., and González-Reyes, A. (2016). ECM-Regulator timp Is Required for Stem Cell Niche Organization and Cyst Production in the *Drosophila* Ovary. *PLOS Genet.* **12**, e1005763.

- Perrimon, N., Ni, J.Q., and Perkins, L. (2010). In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.-F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257–260.
- von Philipsborn, A.C., Liu, T., Yu, J.Y., Masser, C., Bidaye, S.S., and Dickson, B.J. (2011). Neuronal control of *Drosophila* courtship song. *Neuron* 69, 509–522.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619–1628.
- Pronobis, M.I., Deutch, N., and Peifer, M. (2016). The Miraprep: A Protocol that Uses a Miniprep Kit and Provides Maxiprep Yields. *PLoS One* 11, e0160509.
- Raza, Q.S., Vanderploeg, J.L., and Jacobs, J.R. (2017). Matrix Metalloproteinases are required for membrane motility and lumenogenesis during *Drosophila* heart development. *PLoS One* 12, e0171905.
- 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, 4023–4031.
- Reinhardt, D., Mann, K., Nischt, R., Fox, J.W., Chu, M.L., Krieg, T., and Timpl, R. (1993). Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan, and zinc. *J. Biol. Chem.* 268, 10881–10887.
- Reuter, R. (1994). The gene serpent has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* 120, 1123–1135.
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., and Eliceiri, K.W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.
- Salzberg, A. (2019). Alteration in ECM composition affects sensory organ mechanics and function. In Joint Meeting of the German and Israeli Societies of Developmental Biology, GFE.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). Preparation of Plasmid DNA: Toothpick Miniprep. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006, pdb.prot3905.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press.
- Sánchez-Sánchez, B.J., Urbano, J.M., Comber, K., Dragu, A., Wood, W., Stramer, B., and Martín-Bermudo, M.D. (2017). *Drosophila* Embryonic Hemocytes Produce Laminins to Strengthen Migratory Response. *Cell Rep.* 21, 1461–1470.
- Sandmann, T., Jakobsen, J.S., and Furlong, E.E.M. (2006). ChIP-on-chip protocol for genome-wide analysis of transcription factor binding in *Drosophila melanogaster* embryos. *Nat. Protoc.* 1, 2839–2855.
- Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M.Y., Schmied, C., Suchold, D., Stender, B., Janosch, S., Vikas, V.K.J., Krisnan, R.T., et al. (2015). A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699.

- 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*, 664–674.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat. Methods* *9*, 671.
- Schöck, F., Perrimon, N., Schock, F., Schöck, F., Perrimon, N., Musch, A., Lipshitz, H., Kirov, N., Tolkovsky, A., Martinez-Arias, A., et al. (2003). Retraction of the *Drosophila* germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev.* *17*, 597–602.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Pöschl, E., Rao, C., Beier, D.R., Skarnes, W.C., Timpl, R., and Bader, B.L. (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6820–6830.
- Shirangi, T.R., Stern, D.L., and Truman, J.W. (2013). Motor control of *Drosophila* courtship song. *Cell Rep.* *5*, 678–686.
- Siepel, A., and Haussler, D. (2005). Phylogenetic Hidden Markov Models. In *Statistical Methods in Molecular Evolution*, (New York: Springer-Verlag), pp. 325–351.
- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J.S., Hinrichs, A.S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L.W., Richards, S., et al. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* *15*, 1034–1050.
- Sievers, F., and Higgins, D.G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* *27*, 135–145.
- Skaer, H. (1993). The alimentary canal. In *The Development of Drosophila Melanogaster*, Bate M, and Martinez-Arias A, eds. (Cold Spring Harbor (New York): CSH Press), pp. 941–1012.
- Smith, M.F., Ricke, W.A., Bakke, L.J., Dow, M.P.D., and Smith, G.W. (2002). Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol. Cell. Endocrinol.* *191*, 45–56.
- Spradling, A. (1994). Developmental genetics of oogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate, and A.M. Arias, eds. (Cold Spring Harbor (New York): CSH Press), pp. 1–71.
- Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G.M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* *153*, 135–177.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behaviour. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 463.
- Stevens, L.J., and Page-McCaw, A. (2012). A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1068–1079.
- Stockinger, P., Kvitsiani, D., Rotkopf, S., Tirián, L., and Dickson, B.J. (2005). Neural Circuitry that Governs *Drosophila* Male Courtship Behavior. *Cell* *121*, 795–807.
- Takashima, S., Younossi-Hartenstein, A., Ortiz, P.A., and Hartenstein, V. (2011). A novel tissue in an established model system: The *Drosophila* pupal midgut. *Dev. Genes Evol.* *221*, 69–81.

- Tanentzapf, G., Devenport, D., Godt, D., and Brown, N.H. (2007). Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1413–1418.
- 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*, 81–85.
- Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* *14*, 178–192.
- Thurmond, J., Goodman, J.L., Strelets, V.B., Attrill, H., Gramates, L.S., Marygold, S.J., Matthews, B.B., Millburn, G., Antonazzo, G., Trovisco, V., et al. (2019). FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Res.* *47*, D759–D765.
- Timpl, R., and Brown, J.C. (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* *18*, 123–132.
- Trimarchi, J.R., and Schneiderman, A.M. (1994). The motor neurons innervating the direct flight muscles of *Drosophila melanogaster* are morphologically specialized. *J. Comp. Neurol.* *340*, 427–443.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* *40*, e115.
- 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*, 4165–4176.
- Waltzer, L., Bataillé, L., Peyrefitte, S., and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *EMBO J.* *21*, 5477–5486.
- Weirauch, M.T., Yang, A., Albu, M., Cote, A.G., Montenegro-Montero, A., Drewe, P., Najafabadi, H.S., Lambert, S.A., Mann, I., Cook, K., et al. (2014). Determination and Inference of Eukaryotic Transcription Factor Sequence Specificity. *Cell* *158*, 1431–1443.
- Whittaker, C.A., Bergeron, K.-F., Whittle, J., Brandhorst, B.P., Burke, R.D., and Hynes, R.O. (2006). The echinoderm adhesome. *Dev. Biol.* *300*, 252–266.
- Whyatt, D.J., deBoer, E., and Grosveld, F. (1993). The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J.* *12*, 4993–5005.
- Wilk, R., Hu, J., Blotsky, D., and Krause, H.M. (2016). Diverse and pervasive subcellular distributions for both coding and long noncoding RNAs. *Genes Dev.* *30*, 594–609.
- Winick, J., Abel, T., Leonard, M.W., Michelson, A.M., Chardon-Loriaux, I., Holmgren, R.A., Maniatis, T., and Engel, J.D. (1993). A GATA family transcription factor is expressed along the embryonic dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster*. *Development* *119*.
- Wolfstetter, G., and Holz, A. (2012). The role of LamininB2 (LanB2) during mesoderm differentiation in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 267–282.
- 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*, 721–736.

- Wolfstetter, G., Dahlitz, I., Pfeifer, K., Töpfer, U., Alt, J.A., Pfeifer, D.C., Lakes-Harlan, R., Baumgartner, S., Palmer, R.H., and Holz, A. (2019). Characterization of *Drosophila Nidogen/entactin* reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning. *Development* *146*, dev168948.
- Yarnitzky, T., and Volk, T. (1995). Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* *169*, 609–618.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W.J., Cramer, G., Kimbrell, D.A., and Dearolf, C.R. (1997). viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* *198*, 17–25.
- You, J., Zhang, Y., Li, Z., Lou, Z., Jin, L., and Lin, X. (2014). *Drosophila perlecan* regulates intestinal stem cell activity via cell-matrix attachment. *Stem Cell Reports* *2*, 761–769.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1–27.
- Zhai, Z., Kondo, S., Ha, N., Boquete, J.-P., Brunner, M., Ueda, R., Lemaitre, B., Morrison, S.J., Spradling, A.C., Lane, S.W., et al. (2015). Accumulation of differentiating intestinal stem cell progenies drives tumorigenesis. *Nat. Commun.* *6*, 10219.
- Zhu, L.J., Christensen, R.G., Kazemian, M., Hull, C.J., Enuameh, M.S., Basciotta, M.D., Brasefield, J.A., Zhu, C., Asriyan, Y., Lapointe, D.S., et al. (2011). FlyFactorSurvey: a database of *Drosophila* transcription factor binding specificities determined using the bacterial one-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* *39*, D111-7.
- Zhu, P., Ma, Z., Guo, L., Zhang, W., Zhang, Q., Zhao, T., Jiang, K., Peng, J., and Chen, J. (2017). Short body length phenotype is compensated by the upregulation of *nidogen* family members in a deleterious *nid1a* mutation of zebrafish. *J. Genet. Genomics* *44*, 553–556.
- Zinzen, R.P., Girardot, C., Gagneur, J., Braun, M., and Furlong, E.E.M. (2009). Combinatorial binding predicts spatio-temporal cis-regulatory activity. *Nature* *462*, 65–70.

## 8. Internetressourcen

**BDSC** Bloomington *Drosophila* Stock Center, <https://bdsc.indiana.edu/>, 12.04.2019

**CisDb** CIS-BP Database: Catalog of Inferred Sequence Binding Preferences (Weirauch et al., 2014), <http://cisbp.cabr.utoronto.ca/>, 12.04.2019

**Clustal omega** (Sievers and Higgins, 2018), <http://www.clustal.org/omega/>, 12.04.2019

**Consurf** (Ashkenazy et al., 2010, 2016; Celniker et al., 2013), <http://consurf.tau.ac.il/2016/>, 12.04.2019

**DGRC** The *Drosophila* Genomics Resource Center, <https://dgrc.bio.indiana.edu/Home>, 12.04.2019

**DSHB** The Developmental Studies Hybridoma Bank, <http://dshb.biology.uiowa.edu/>, 12.04.2019

**Flybase** A Database of *Drosophila* Genes & Genomes (Thurmond et al., 2019), <http://flybase.org/>, 12.04.2019

**Fly-FISH** A database of *Drosophila* embryo and larvae mRNA localization patterns (Lécuyer et al., 2008; Wilk et al., 2016), <http://fly-fish.cabr.utoronto.ca/>, 12.04.2019

**Flytrap** <https://medicine.yale.edu/lab/cooley/flytrap/>, 12.04.2019

**Google scholar** <https://scholar.google.de/>, 12.04.2019

**Jaspar** (Khan et al., 2018), <http://jaspar.genereg.net/>, 12.04.2019

**Kyoto DGGR** KYOTO Stock Center, <https://kyotofly.kit.jp/cgi-bin/stocks/index.cgi>, 12.04.2019

**Mendely** <https://www.mendeley.com>, 12.04.2019

**NCBI** National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/n>, 12.04.2019

**Primer3** <http://primer3.ut.ee/>, 12.04.2019

**Smart** a Simple Modular Architecture Research Tool, <https://smart.embl.de/>, 12.04.2019

**The Interactive Fly** A cyberspace guide to *Drosophila* development and metazoan evolution, <https://www.sdbonline.org/sites/fly/aimain/1aahome.htm>, 12.04.2019

**Uniprot** The Universal Protein Resource, <https://www.uniprot.org/>, 12.04.2019

**UCSC** The UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>, 12.04.2019

**VDRC** Vienna *Drosophila* Resource Center, <https://stockcenter.vdrc.at/control/main>, 12.04.2019

## 9. Versicherung

Versicherung gemäß §17 (2) der Promotionsordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche 22.07.2015 der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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

An erster Stelle möchte ich Frau Dr. Anne Holz dafür danken, mich betreut und wissenschaftlich ausgebildet zu haben. Deine ehrliche Art, der Freiraum, den du mir gegeben hast, und deine intensive Betreuung haben mich so weiterentwickeln lassen. Deine Mühe Wissenschaft zu betreiben und Wissenschaftler auszubilden, sollten viel mehr honoriert werden. Ohne diesen immensen Aufwand wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte dir von ganzem Herzen danken!

Bei Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Zurverfügungstellung der Labore und des Arbeitsplatzes am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes und die Begutachtung bedanken.

Frau Dr. Susanne Önel möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit danken. Frau Prof. Dr. Tina Trenczek und Herrn Prof. Dr. Nicola Pripic-Schäper möchte ich danken, sich als Prüfer zur Verfügung zu stellen.

Frau M.Sc. Ina Dahlitz möchte ich dafür danken, mich immer wieder aufgebaut zu haben und die Unterstützung im Laboralltag. Diese Zeit wäre ohne dich sicherlich schwerer gewesen. Herrn M. Sc. Maik Bischoff möchte ich für die Klonierung der *LanB2* Reportergergenkonstrukte danken. Dein Ehrgeiz und dein wissenschaftliches Interesse haben mich immer wieder angespornt. Frau Dipl. Biol. Yvette von Bredow und Dr. „Hubi“ von Bredow möchte ich für so manche Hilfestellung und Unterstützung danken. Herrn Martin Speckmann und M.Sc. Anton Müller danke ich für die unterhaltsamen Begegnungen im Labor und die Hilfsbereitschaft.

Frau PD Dr. Ellen Kauschke danke ich für das Interesse an meinen Seminaren und die daran anschließenden guten Fragen. Herrn Dr. Marek Bartkuhn danke ich für die Unterstützung bei dem CHIP-Experiment und die Tipps für die bioinformatischen Analysen.

Ein großer Dank geht an die Mitarbeiter des Instituts für Allgemeine und Spezielle Zoologie. Frau Renate Plaß danke ich für die Einführung in die Kryo-Mikrotomtechnik, Frau Susanne Vasoldt-Kröckel für die Hilfe der Anfertigung von histologischen Schnitten mit Technovit und Herrn Stefan Scheld für die Nachhilfe in der Western-Blot-Technik. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Euch für die Hilfe bei so mancher „lästiger“ Arbeit. Dem gesamten Institut gilt Dank für das freundliche Arbeitsklima.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die moralische Unterstützung und den Rückhalt sowie dem Korrekturlesen dieses Manuskriptes.

# 11. Appendix

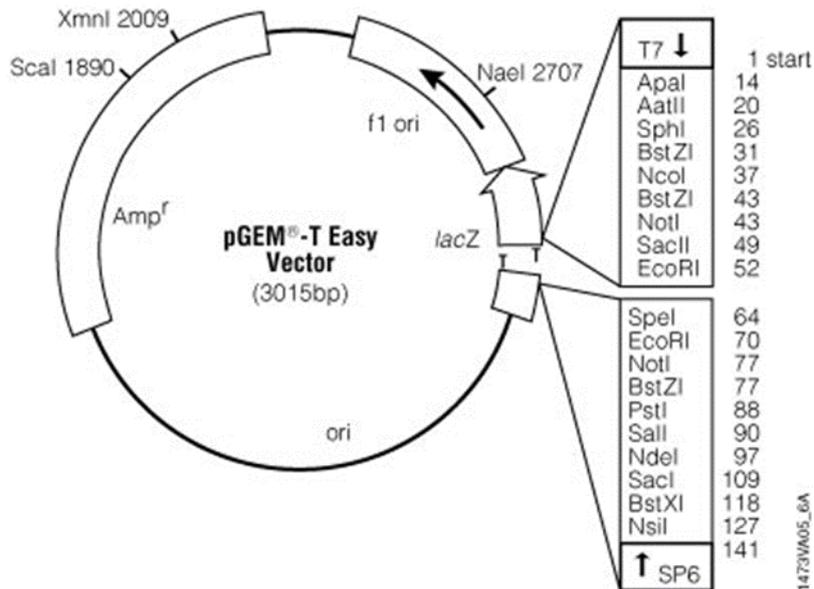


Abbildung A1: Vektorkarte des pGEM-T-Easy-Vektors. (<https://www.promega.de/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>, stand: 12.4.2019).

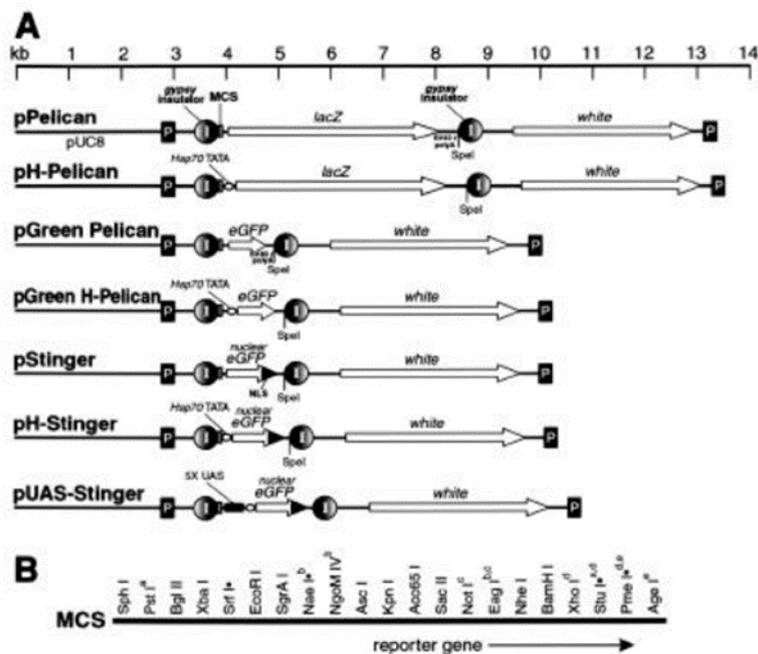
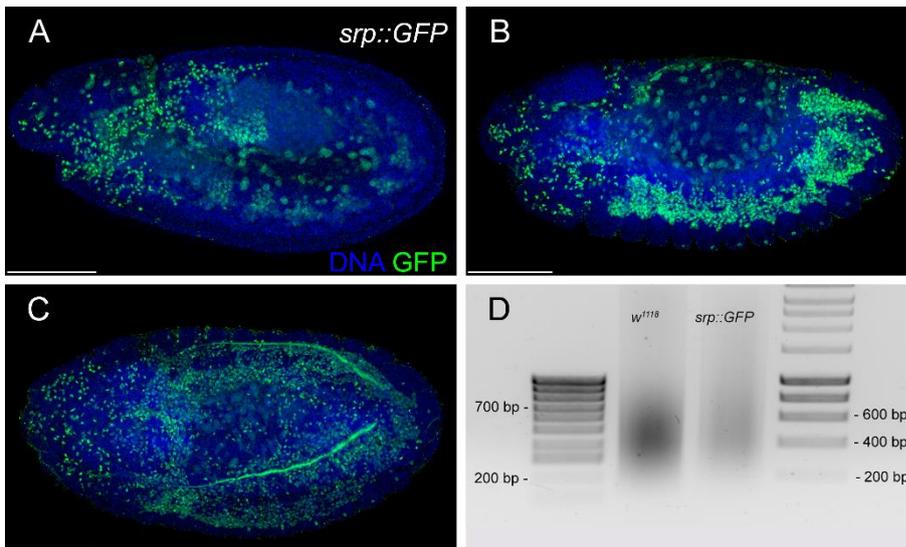
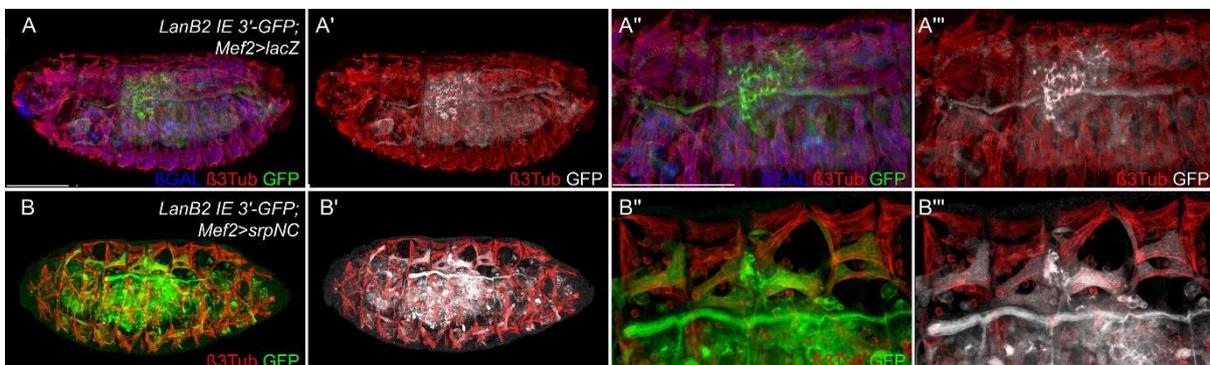


Abbildung A2: Vektorkarte des pGreen H Pelican-Transformationsvektors. (Barolo et al., 2000).



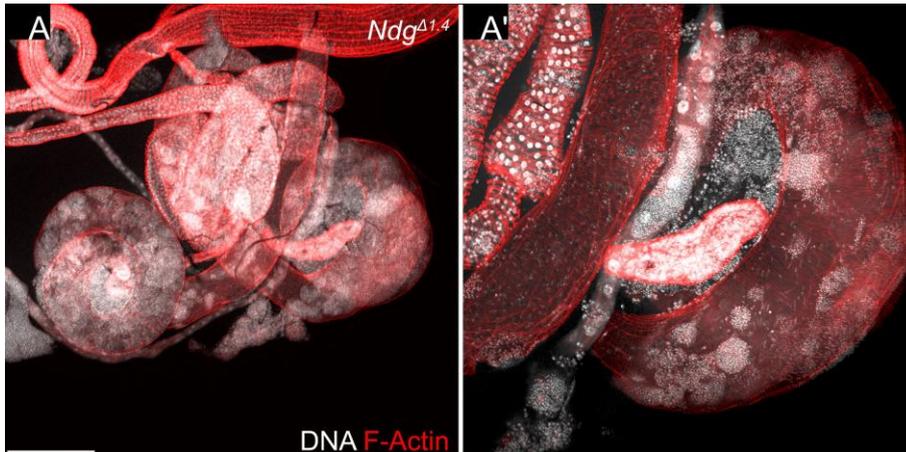
**Abbildung A3: Proteinlokalisierung von *serpent::GFP* und Sonifizierungskontrolle des CHIP-Inputs. (A-C)** GFP-Antikörperfärbung an Embryonen mit dem Genotyp *srp::GFP* in den Stadien 11 (A), 13 (B) und (15). **(D)** Die Fragmentlänge des Großteils des sonifizierten Chromatins liegt bei den Ansätzen *w<sup>1118</sup>* und *srp::GFP* zwischen 200 und 600 bp. Messbalken = 100 µm.



**Abbildung A4: Myogene Serpent Expression führt zur ektopischen *Laminin B2* Reporterexpression und gestörter Myogenese. (A-A''')** Kontrolltiere zeigen GFP Reporterexpression von *LanB1 IE 3'-GFP* (A, A'' in grün, A', A''' in weiß) und *Mef2-GAL4* getriebene *UAS-lacZ* Aktivität (A, A'' in blau) mit anti- $\beta$ 3Tubulin als Muskelmarker (rot). **(B-B''')** Ektopische Expression von *UAS-srpNC* mit *Mef2-GAL4* reicht aus um *LanB2* Reporterexpression in somatischen Muskeln und unfusionierten Myoblasten zu aktivieren und führt zu einer gestörten Myogenese. GFP-Reporterexpression (B, B'' grün; B', B''' weiß) und anti- $\beta$ 3Tubulin (rot). Messbalken = 100 µm.

**Tabelle A1: Spezies und entsprechende Orthologe mit benutzten Ndg Aminosäuresequenzen.**

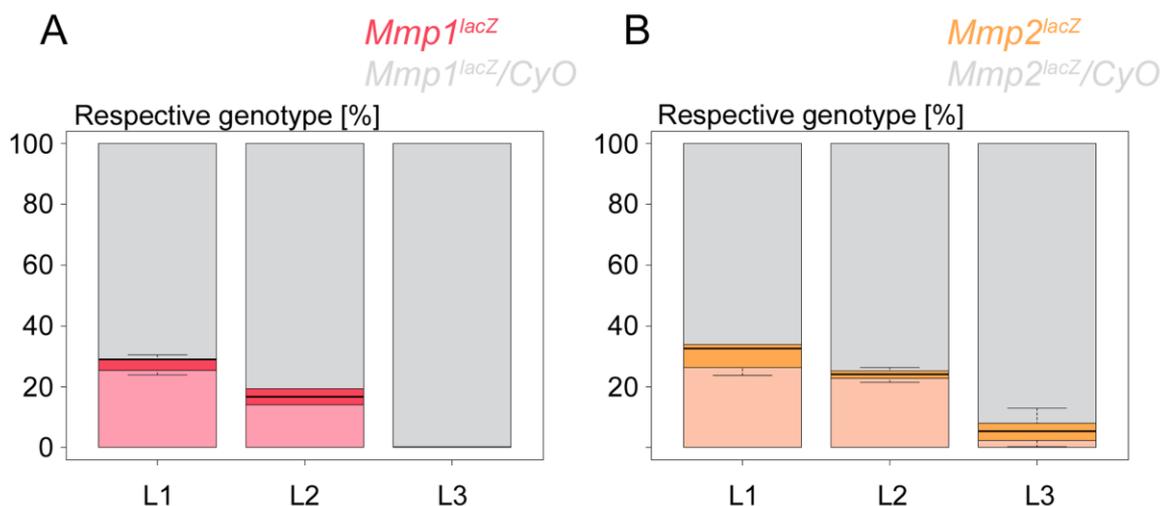
Spezies	Ndg Ortholog	Spezies	Ndg Ortholog
<i>Drosophila melanogaster</i>	Ndg	<i>Musca domestica</i>	<i>nidogen-2</i>
<i>Drosophila sechellia</i>	GM21210	<i>Aedes aegypti</i>	<i>nidogen-2</i>
<i>Drosophila simulans</i>		<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP008193
<i>Drosophila yakuba</i>	GE19355	<i>Bombyx mori</i>	<i>low density lipoprotein receptor</i>
<i>Drosophila erecta</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Danaus plexippus</i>	DPOGS205117
<i>Drosophila ananassae</i>		<i>Apis mellifera</i>	<i>nidogen-2</i>
<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>	GA24376	<i>Linepithema humile</i>	<i>nidogen-2</i>
<i>Drosophila persimilis</i>	<i>nidogen-1</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>nidogen-1</i>
<i>Drosophila willistoni</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	<i>Uncharacterized protein W4YJU2</i>
<i>Drosophila mojavensis</i>	GI19329	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>nid-1</i>
<i>Drosophila virilis</i>	GJ22207	<i>Danio rerio</i>	<i>nid1a</i>
<i>Drosophila grimshawi</i>	GH21783		<i>nid1b</i>
<i>Drosophila takahashii</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>nid2a</i>
<i>Drosophila suzukii</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>nid2b</i>
<i>Drosophila biarmipes</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>nid1</i>
<i>Drosophila eugracilis</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>nid2</i>
<i>Drosophila ficusphila</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Nidogen</i>
<i>Drosophila serrata</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>Uncharacterized protein F1NDL4</i>
<i>Drosophila kikkawai</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Cavia porcellus</i>	<i>NID1</i>
<i>Drosophila rhopaloa</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>NID2</i>
<i>Drosophila bipectinata</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Nid1</i>
<i>Drosophila miranda</i>	<i>nidogen-1</i>		<i>Nid2</i>
<i>Drosophila obscura</i>	<i>nidogen-1</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Nid1</i>
<i>Drosophila arizonae</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>Nid2</i>
<i>Drosophila navojoa</i>	<i>nidogen-2</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>NID1</i>
<i>Drosophila hydei</i>	<i>nidogen-2</i>		<i>NID2</i>
<i>Drosophila busckii</i>	<i>nidogen-2</i>		



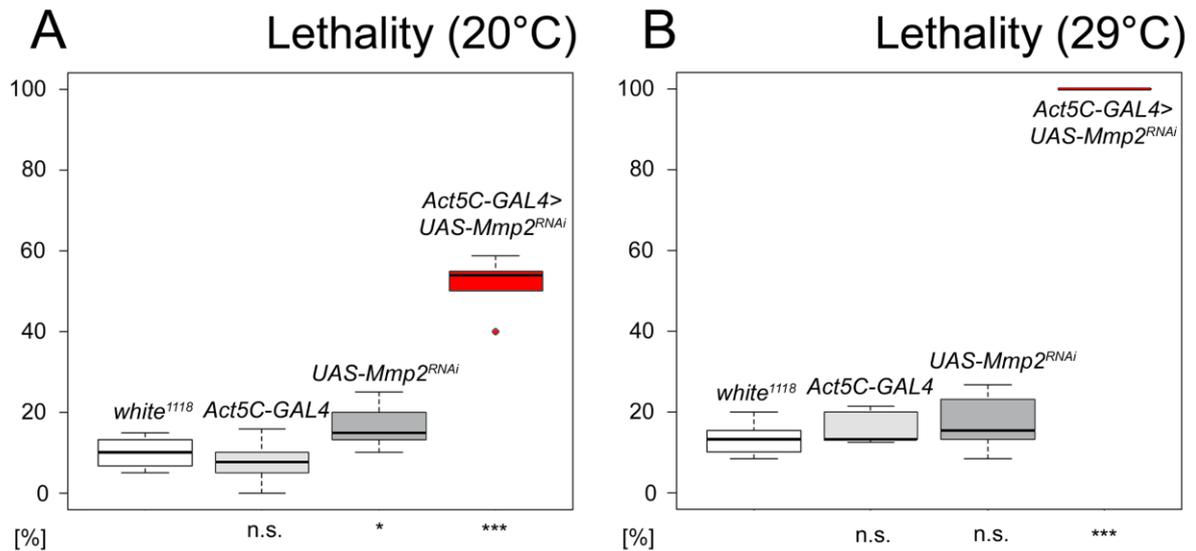
**Abbildung A5: Testis von *Nidogen* Mutanten. (A, A')** Markierung der DNA (weiß) und F-Actin (rot) eines 13 Tage alten *Ndg*<sup>Δ1.4</sup> mutanten Testis.

**Tabelle A2: Letalität von *Mmp* Allelen.**

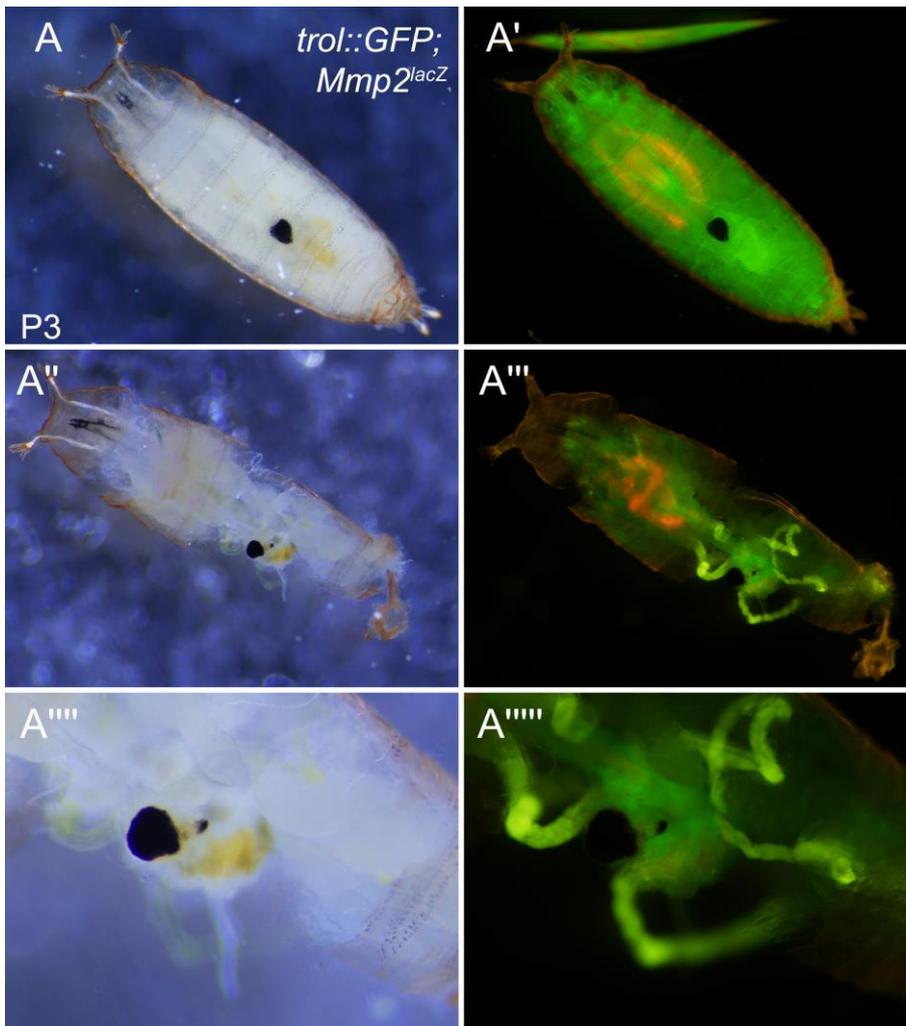
	<i>Mmp1</i> <sup>lacZ</sup>	<i>Mmp1</i> <sup>2</sup>	<i>Mmp1</i> <sup>Q112stop</sup>	<i>Mmp1</i> <sup>MI0378</sup>	<i>Mmp2</i> <sup>lacZ</sup>	<i>Mmp2</i> <sup>eGFP</sup>	<i>Mmp2</i> <sup>MI02914</sup>
<i>Mmp1</i> <sup>lacZ</sup>	letal	letal	letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal
<i>Mmp1</i> <sup>2</sup>	letal	letal	letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal
<i>Mmp1</i> <sup>Q112stop</sup>	letal	letal	letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal
<i>Mmp1</i> <sup>MI0378</sup>	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal
<i>Mmp2</i> <sup>lacZ</sup>	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	letal	letal	letal
<i>Mmp2</i> <sup>eGFP</sup>	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	letal	letal	letal
<i>Mmp2</i> <sup>MI02914</sup>	nicht letal	nicht letal	nicht letal	nicht letal	letal	letal	letal



**Abbildung A6: *Mmp* Letalität in verschiedenen Larvenstadien. (A)** Anteil von homozygoten *Mmp1*<sup>lacZ</sup> Tieren über die drei Larvalstadien hinweg (L1 = 27,61 % ± 2,8 %; L2 = 16,75 % ± 3,8 %; L3 = 0 % ± 0 %). **(B)** Anteil von homozygoten *Mmp2*<sup>lacZ</sup> Tieren über die drei Larvalstadien hinweg (L1 = 30,11 % ± 4,77 %; L2 = 23,93 % ± 2,45 %; L3 = 5,73 % ± 5,02 %). T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\* p < 0,0001; \*\* = p < 0,01; \* = p ≤ 0.005, nicht signifikant (n. s.) = p > 0.05. Mittelwert ± SD.



**Abbildung A7: Letalitätstest nach *Mmp2* Knockdown.** Letalitätstest an *white*<sup>1118</sup>; *Act5C-GAL4*, *UAS-mCD8::RFP* und *UAS-Mmp2-RNAi* Kontrollen und *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP > UAS-Mmp2-RNAi* Tieren bei **(A)** 20 °C und bei **(B)** 29 °C. Die prozentualen Mittelwerte bei 20 °C liegen bei *white*<sup>1118</sup> = 10 % ± 4,25 %; *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP* = 7,7 % ± 5,86 %; *UAS-Mmp2-RNAi* = 16,67 % ± 5,89 % und bei *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP* = 51,53 % ± 7,17 %. Die prozentualen Mittelwerte bei 29 °C liegen bei *white*<sup>1118</sup> = 13,41 % ± 4,6 %; *Act5C-GAL4, UAS-mCD8::RFP* = 16,12 % ± 4,24 %; *UAS-Mmp2-RNAi* = 17,36 % ± 7,43 % und bei *Act5C-GAL4 > UAS-mCD8::RFP, UAS-Mmp2-RNAi* = 100 % ± 0 %. T-Test mit folgenden p-Werten: \*\*\* p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p ≤ 0.005, nicht signifikant (n. s.) = p > 0.05. Mittelwerte ± SD. n = 5, 30 Tiere pro Ansatz.



**Abbildung A8: *Mmp2<sup>lacZ</sup>* Phänotyp.** (A, A'', A''') Hellfeldaufnahme und (A', A''', A''''') Aufnahme der endogenen GFP-Fluoreszenz einer Puppe im Stadium 3 mit dem Genotyp *trol::GFP; Mmp2<sup>lacZ</sup>*. Übersicht über die intakte Puppe (A, A') und Mitteldarm, der freipräpariert wurde (A'', A''', A''''', A'''''). Am Mitteldarm befindet sich in der *Mmp2* Verlustsituation melaniertes, tumorartiges Gewebe, der Fettkörper ist nicht dissoziiert und der Mitteldarm nicht kontrahiert.