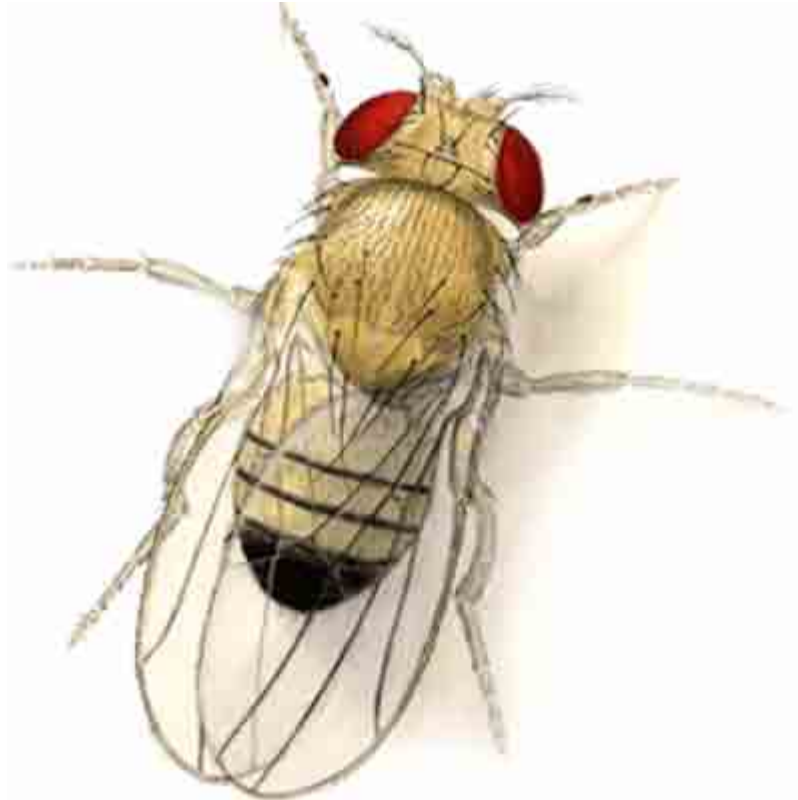


**Skript zum Mastermodul Zoologie
„Entwicklungsgenetik“**



Räume: 35 / 205 - 208

Zeitraum: 15. 03. 2021 - 26. 03. 2021

**Maik Drechsler, Heiko Harten, Nora Klinke, Christian Meyer, Jonas Olbrich,
Ronja Schiemann und Achim Paululat**

Universität Osnabrück, Abteilung Zoologie/Entwicklungsbiologie

1. Einführung

Seit T. H. Morgan im Jahre 1909 die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Objekt für genetische Studien eingeführt hat, ist ein großer Teil unseres Wissens über die Vererbungsmechanismen durch *Drosophila*-Experimente gewonnen worden. Die kurze Generationszeit, die leichte Anzucht, die geringe Zahl an Chromosomen ($n = 4$) oder auch die Möglichkeit der Analyse von Polytänchromosomen sind nur einige der Vorteile, die das Arbeiten mit *Drosophila* so erfolgreich gemacht haben. Die hohe Zahl von Nachkommen eines Elternpaares (bis zu 500) erlaubt eine gute statistische Auswertung der Versuchsergebnisse. So können ohne Schwierigkeit (auch im Schulversuch) die genetischen Prinzipien der Weitergabe von Genen, der Genkoppelung, der meiotischen Segregation und Rekombination oder die Wirkung von Chromosomenaberrationen demonstriert werden.

1.1 Literatur zum Thema *Drosophila*

Campos-Ortega José A, Hartenstein Volker: The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. SpringerVerlag, Berlin 1985

Demerec M (ed): Biology of *Drosophila*. Hafner Publishing Company, New York, 1950 (Nachdruck 1965)

Drosophila Information Service (DIS) (Zeitschrift)

Herskowitz IH: Bibliography on the Genetics of *Drosophila*, Part 6. The Macmillan Company New York, 1974 Part 7. In DIS 51-56 (1981)

King RC: Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, 1970.

Lindsley D.L., Grell EH: Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington, Publ. Nr. 627, 1968.

Lindsley D, Zimm G: The Genome of *Drosophila melanogaster*

Part 1: Genes A-K (DIS 62, 1985)

Part 2: lethals; maps (DIS 64, 1986)

Part 3: rearrangements (DIS 65, 1987)

Part 4: Genes L-Z (DIS, 1990)

Ransom R (ed): A handbook of *Drosophila* development. Elsevier Biomedical, Amsterdam 1982

Roberts DB(ed): *Drosophila* – a practical approach. IRL Press, Oxford 1986

Ashburner: The Genetics and Biology of *Drosophila*.

Vol. 1a – 1c: Genetics (Hrsg. Ashburner M, Novitski E)

Vol. 2a – 2d: Development (Hrsg. Ashburner M, Wright TRF).

Academic Press, London – New York, ab 1976.

Wilkins Adam S: Genetic analysis of animal development.

John Wiley & Sons, New York 1986

1.2 Literatur zum Thema Entwicklungsbiologie

Lewis Wolpert: Principles of Development; Oxford Press. Dieses Buch ist in deutscher und englischer Sprache erhältlich. Es gibt einen Einstieg in die Entwicklungsbiologie auch von *Drosophila*.

Scott Gilbert: Developmental Biology Sinauer. Das zurzeit beste Fortgeschrittenen-Buch zur Entwicklungsbiologie.

Müller, Hassel: Entwicklungsbiologie, Springer.

Janning, Knust: Genetik: Thieme-Verlag, Entwicklungsgenetik von *Drosophila*.

1.3 Internet-Seiten

<http://www.uni-tuebingen.de/genetiery/online.html> (Interaktive Ausbildungsseite zur *Drosophila*-Entwicklungsbiologie). Pflicht für alle Kursteilnehmer

<http://flymove.uni-muenster.de/> (Ausbildungsseite mit Filmen, Bildern etc. zu *Drosophila*). Pflicht für alle Kursteilnehmer

<http://flyview.uni-muenster.de/> (Wie flymove, Bilder eher für Wissenschaftler)

<http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimain/1aahome.htm>: The interactive fly: A cyberspace guide to *Drosophila* genes and their roles in development

<http://www.fruitfly.org/> (Berkeley *Drosophila* Genome Project)

<http://fly.bio.indiana.edu/> (American *Drosophila* Stock Center)

<http://www.ucalgary.ca/UofC/eduweb/virtualembryo/> (The Virtual Embryo)

<https://flybase.org/> (A Database of *Drosophila* Genes & Genomes)

2. Lebenszyklus von *Drosophila*

Der Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster* umfasst eine eintägige Embryonalentwicklung, in der alle Organe der zukünftigen Larve angelegt und gebildet werden. Sehr viele grundlegende zell- und entwicklungsbiologische Prozesse sind an *Drosophila*-Embryonen erforscht worden, beispielsweise die Bildung der Körperachsen, die Segmentierung, die Muskelbildung und vieles mehr. An die Embryonalentwicklung (Embryogenese) schließen sich drei durch Häutungen voneinander getrennte larvale Stadien an, die im englischen als 1st, 2nd und 3rd instar larvae bezeichnet werden. Während der sich anschließenden Metamorphose wandelt sich die Larve zur Puppe und die Imago entsteht.

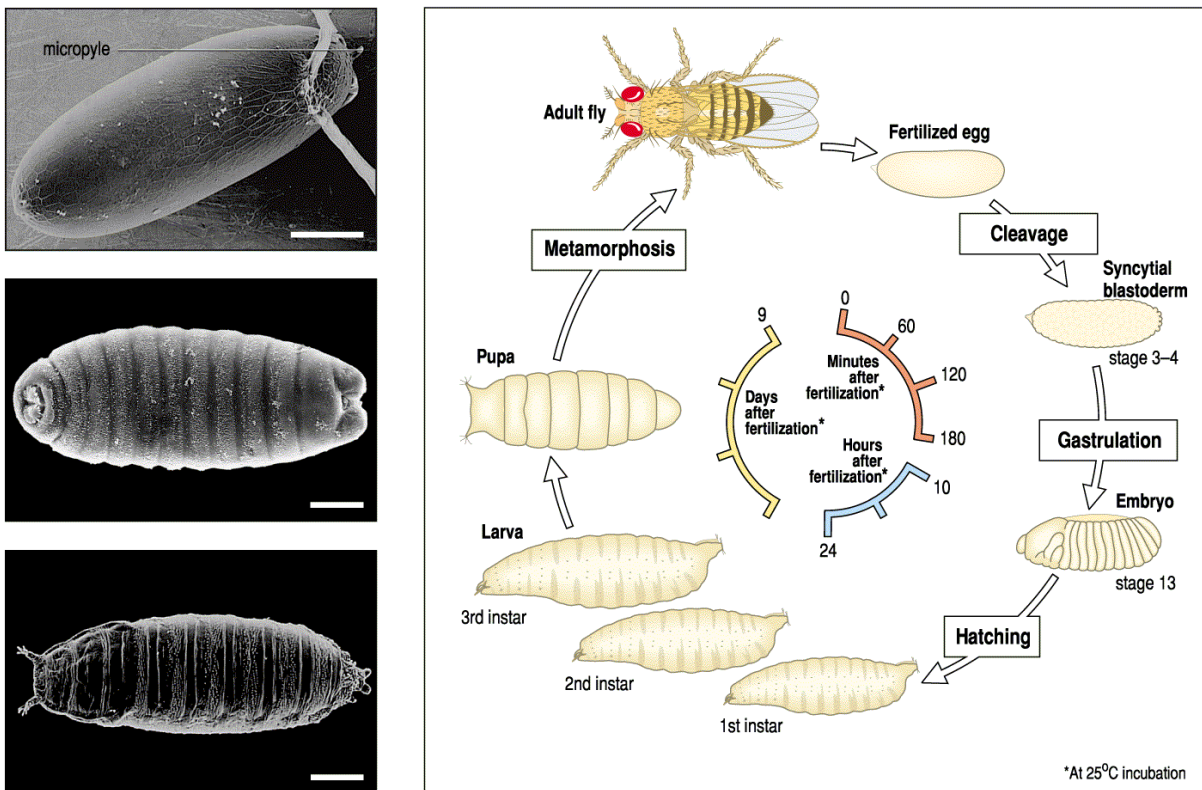


Abb.: Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster* (aus Wolpert: Principles of Development)

Stadium	Durchschnittliche Entwicklungsdauer (bei 25 °C)
Embryonalentwicklung	1 d
1. Larvenstadium	1 d
2. Larvenstadium	1 d
3. Larvenstadium	2 d
Puppe	4,5 d
Adultstadium	40-50 d

2.1 Embryonalentwicklung

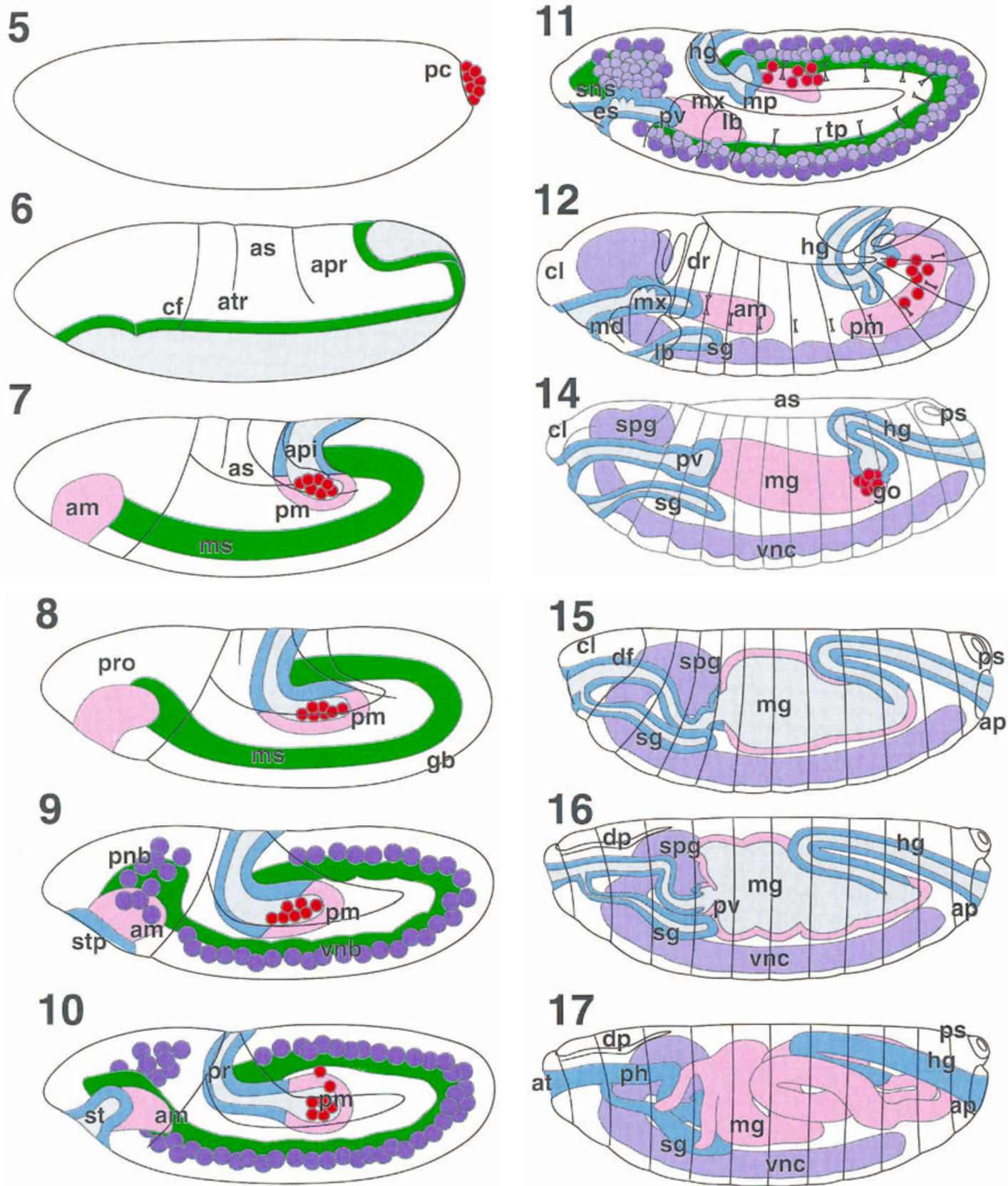
Das Ei von *Drosophila melanogaster* (etwa 0,5mm x 0,2mm) ist von einer festen Hülle (Chorion) umgeben. In der Nähe des Vorderpols entspringen zwei dünne Filamente, die ein völliges Versinken des Eis im Substrat verhindern sollen. Am Vorderpol befindet sich die Mikropyle als Eintrittsöffnung für die Spermien. Das Ei wird auf dem Weg vom Ovidukt zum Uterus besamt, etwa während der ersten meiotischen Teilung.

Zeit (h)	Durchschnittliche Entwicklungsdauer (bei 25 °C)
0	Eiablage. Nach der Befruchtung (im Uterus) folgen 7 synchrone Kernteilungen, die zu 128 syncytialen Furchungskernen führen.
1,5 - 2,5	Etwa 100 Kerne wandern ins periphere Rindenplasma, ca. 25 Kerne bleiben im zentralen Dotter. Nach der 8. Kernteilung beginnen 2-3 der peripheren Kerne am posterioren Pol mit der Bildung der Polzellen (=Keimbahn!). Nach der 9. und 10. Kernteilung kann man drei Regionen unterscheiden: a) Am Hinterpol teilen sich die 8-12 Polkerne asynchron und bilden schließlich etwa 30-50 Polzellen. b) Im zentralen Dotter gibt es etwa 200 Vitellophagenkerne, die später polyploidisieren. c) Die Kerne der Peripherie durchlaufen 3 weitere synchrone Kernteilungen (11.-13. Teilung) und bilden das syncytiale Blastoderm.
3	Zellmembranen werden von außen nach innen gebildet: das zelluläre Blastoderm mit ca. 6000 Zellen ist entstanden.
3,5 - 4	Gastrulation (Abbildung)
18	Differenzierung weitgehend abgeschlossen, Imaginalscheiben angelegt
22 - 24	Larven schlüpfen

Beschriftung zur nachstehenden Bildtafel

Fig. 1.1. Twelve drawings of embryos of increasing age illustrating the major events of *Drosophila* embryonic development. The number at the top left of each drawing indicates the embryonic stage (see Chapter 2). Stage 5 shows the blastoderm with the pole cells (*pc*) at the posterior pole. Stage 6 illustrates morphogenetic movements during gastrulation. Light shading indicates the larval anlagen that will invaginate during gastrulation, i.e. anlagen of the endodermal anterior midgut primordium (*am*), mesoderm (*ms*), proctodeum and posterior midgut primordium (*pm/pr*). The cephalic furrow (*cj*) separates the procephalon from the prospective metameric germ band; anterior (*atr*) and posterior (*ptr*) transverse furrows are visible. *apr* amnioproctodeal invagination; *as* amnioserosa. Mesoderm and endoderm have completed invagination, invaginated regions are shaded in lateral projection (hollow spaces -lumina- in this and following drawings are hatched), pole cells are included in the posterior midgut primordium. Stage 7 illustrates the beginning of germ band elongation. The cephalic furrow is tilted caudalwards; transverse furrows are approaching each other; the amnioproctodeal invagination (*api*) has deepened. During stage 8 germ band elongation proceeds further; the primordia of the posterior midgut and the proctodeum become individualized. In stage 9 germ band elongation enters its slow phase; the stomodeal plate (*stp*) becomes visible; the mesoderm transiently exhibits segmental bulges; segregation of neuroblasts (*vnb* ventral neuroblasts; *pnb* procephalic neuroblasts) begins. In stage 10 stomodeal invagination (*st*) takes place; segregation of the neuroblasts continues, first neuroblast divisions occur to give rise to ganglion mother cells. In stage 11 epidermal segmentation becomes evident; *tp* tracheal pits; *mx* maxillary bud; *lb* labial bud; *es* oesophagus; primordia of the stomatogastric nervous system (*sns*) and Malpighian tubules appear; pole cells leave the posterior midgut pocket (*mp*) and become arranged laterally. The Malpighian tubules have been omitted in this and the following drawings. *c/* clypeolabrum; *ph* pharynx; *pm* posterior midgut; *hg* hindgut; *md* mandibular bud. The germ band retracts during stage 12, the drawing shows the final stages of this retraction. During this process fusion of the anterior and posterior midgut primordia takes place and the definitive segmental boundaries appear. The salivary glands (*sg*) and the dorsal ridge (*dr*) appear. In stage 14 dorsal closure of the midgut and epidermis, and head involution begin. *df* dorsal fold; *hg* hindgut; *mx* maxillary bud; *spg* supraoesophageal ganglion; *ps* posterior spiracles; *vnc* ventral cord. In stage 15 head involution is well advanced. Notice growth of the hindgut. *ap* anal pad; *c/* clypeolabrum; *df* dorsal fold; *ph* pharynx; *sg* salivary glands; *tl* prothorax. In stage 16 head involution is almost complete, midgut (*mg*) constrictions appear, condensation of the ventral cord (*vnc*) begins. Stage 17 corresponds to the fully developed embryo. *at* atrium; *c/* clypeolabrum; *es* oesophagus; *hg* hindgut; *mg* midgut; *ph* pharynx; *pv* proventriculus; *sg* salivary glands; *ps* posterior spiracles.

Modified from Hartenstein (1993), with permission of Cold Spring Harbor Laboratory Press.



Benennung der Stadien:

Stadium	Zeit (min)	Ereignis
1	0-15	Fusion der Pronuclei
2	15-70	Präblastoderm (mitotische Zyklen 1-9)
3	70-90	Polzell-Bildung
4	90-130	Syncytiales Blastoderm (mitotische Zyklen 10-13)
5	130-180	Zellularisierung des Blastoderms (14. Zyklus)
6	180-195	Gastrulation: Einwanderung von Meso- und Entoderm, Polzellen gelangen in die Mitteldarmanlage
7	195-200	Beginn der Keimstreifstreckung
8	200-230	Rasche Keimstreifstreckung
9	230-260	Langsame Keimstreifstreckung, Segmentierung der Neuroblasten
10	260-320	Gnathale und clypeolabrale Wölbung, Stomodaeum
11	320-440	Epidermal erkennbare parasegmentale Gliederung
12	440-580	Verkürzung des Keimstreifs (Ausrollung)
13	560-620	Ende der Keimstreifverkürzung, Differenzierung des CNS
14	620-680	Rückenschluss, Involution der Kopfstrukturen
15	680-800	Ende des Rückenschlusses, Involution der Imaginalanlagen
16	800-900	Dentikelstrukturen sichtbar
17	21-22h	Schlupf: Beginn des 1sten Larvenstadiums

2.2 Larvalentwicklung

Die Larve (Abbildung im Anhang) ist weiß, wurmförmig und segmentiert. An der verjüngten Kopfregion ist eine Chitinstuktur mit schwarzen Mundhaken erkennbar. Die beiden Haupttracheenstämme führen am Vorder- und Hinterende der Larve nach außen (Spirakel). Da die Kutikula nicht dehnbar ist, müssen regelmäßige Häutungen ablaufen, damit die verpuppungsreife Endgröße erreicht wird.

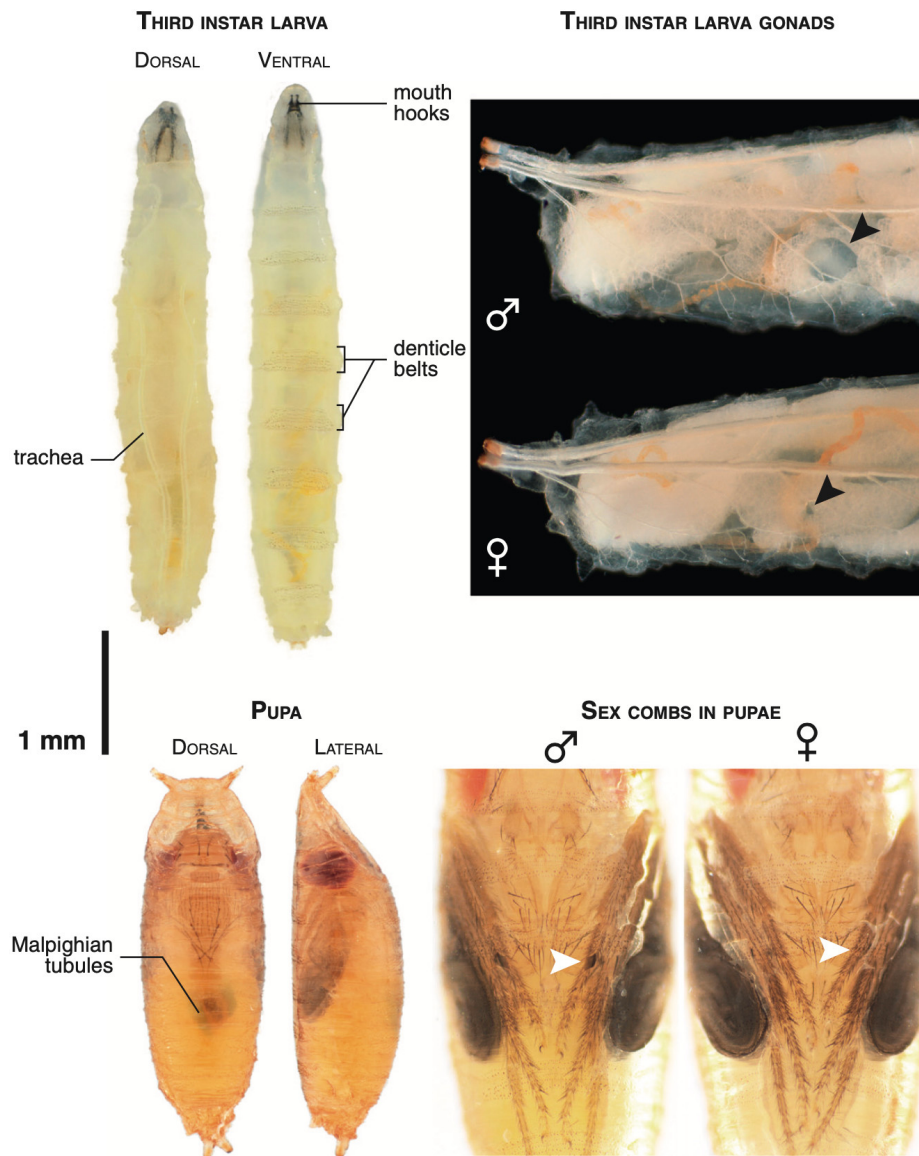


Abb. aus Chyb & Gompel: Atlas of *Drosophila* Morphology

Zeit (h, bei 25 °C)	
24	Schlüpfen aus dem Ei: Beginn des 1. Larvenstadiums (LSt). Fressen und Wachsen. Zellproliferation in den Imaginalanlagen; Dauer: 1 Tag.
48	1. Larvenhäutung: Beginn des 2. LSt. Prinzipiell gleich wie 1 LSt.
72	2. Larvenhäutung: Beginn des 3. LSt. In diesem 2 Tage dauernden Stadium wächst die Larve erheblich. Am Ende des 5. Tages oder am 6. Tag nach Eiablage beginnt die Metamorphose.

2.3 Metamorphose

Zur Vorbereitung der Verpuppung verlässt die Larve den Futterbrei und kriecht an der Wand des Zuchtgefäßes nach oben. Sie wird immobil, stülpt die vorderen Spirakeln nach außen und verkürzt sich.

Zeit nach Eiablage, bei 25 °C		
118 h	5 d	Die Larvenkutikula verhärtet sich und ist zunächst weiß
119	5	Puparium gelblich
120	5	Puparium dunkel ausgefärbt
122	5	Vorpuppe häutet sich innerhalb des Pupariums
130	5,5	Eversion von Kopf, Flügeln und Beinen
167	7	Augenpigmente
187	8	Hodenpigment, Borstenpigment
214	9	Schlüpfen der Imago
215	9	Entfalten der Flügel; Imago geschlechtsreif
222	9	Hoden enthält bewegliche Spermien
	11	Weibchen beginnt mit der Eiablage

Während der Metamorphose zerfällt die Larvenorganisation weitgehend (z. B. Speicheldrüsen, Darm, larvale Epidermis). Die Adultstrukturen werden über Neusynthese (adulte Epidermis, innere und äußere Genitalien mit Ausnahme der Gonaden) bzw. aus den übrigen imaginalen Anlagen (adulte Speicheldrüsen, Darm) gebildet.

2.4 Parameter der Entwicklungsdauer

Temperatur: bei 25 °C etwa 10 Tage; im Bereich von ca. 25 ± 3 °C hat 1 °C mehr oder weniger eine ca. 1 Tag kürzere oder längere Entwicklungszeit zur Folge. Temperaturen über 30 °C führen zu sterilen Männchen. Unter etwa 14 °C kommt es zu einem Entwicklungsstillstand

Futterqualität

Populationsdichte

Feuchtigkeit

Genotyp

Geschlecht: Weibchen etwas schneller als Männchen

2.5 Unterscheidung der Geschlechter

Männchen: Kleiner als Weibchen; abgerundetes Abdomen mit stark pigmentierten terminalen Abdominaltergiten; äußere Genitalien stark chitinisiert; Geschlechtskamm auf Basitarsus des 1. Beins (Abbildung im Anhang). stark hervortretende Analplatten (Abbildung im Anhang).

Weibchen: Größer als Männchen; spitz zulaufendes Abdomen; schwächer pigmentiert

Seitenansicht

Weibchen

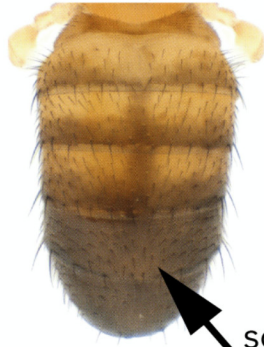


Männchen

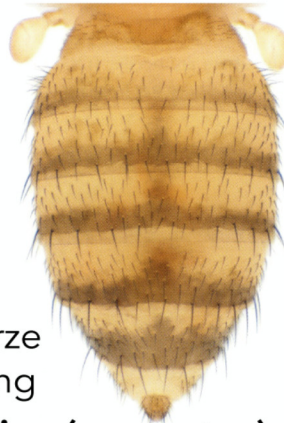


schwarze
Färbung

Hinterleib (von oben)



schwarze
Färbung



Vorderes Bein

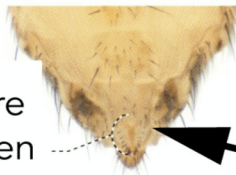


Hinterleib und Genitalien (von unten)



Männchen

sichtbare
Genitalien



Weibchen

Männchen

Weibchen

Chyb and Gompel 2013 "Atlas of *Drosophila* Morphology - Wild-type and Classical Mutants" Academic Press, imprint of Elsevir, USA

2.6 Zuchtmethode

Zuchtgefäße

Als Zuchtgefäße sind Plastikröhrchen oder -flaschen von etwa 8 x 2,5 cm bis zur Größe von 1 L Inhalt geeignet. Von besonderem Vorteil sind Gefäße, die sich zur Öffnung konisch verjüngen. Dadurch wird beim Abschütteln von Fliegen ein Herausfallen des Futterbreis weitgehend verhindert. Alle verwendeten Zuchtgefäße sollten den gleichen Öffnungsdurchmesser haben, um ein Umsetzen von nicht betäubten Fliegen zu erleichtern. Das Gefäß wird mit einem Stopfen bestehend aus porösem Kunststoff (Gasaustausch!) verschlossen. Gefäße und Stopfen sollten vor ihrer Verwendung sterilisiert werden.

Futter

- 1400 ml Wasser
- 100 g Maisgries
- 70 g Zucker
- 15 g Agar-Agar
- 25 g Trockenhefe
- 5 ml Propionsäure und/oder
- 1 Messerspitze „Nipagin“
- frische Bäckerhefe

Mais, Zucker, Agar-Agar, Trockenhefe in 500ml kaltem Wasser anrühren und zu 500ml kochendem Wasser geben. Diesen Brei unter Rühren zum Sieden bringen und etwa 10 min weiterkochen. Propionsäure, Nipagin und 400ml kaltes Wasser zugeben und bis kurz vor dem Siedepunkt erhitzen. Futterbrei heiß in Zuchtgefäße abfüllen (etwa 2cm hoch); diese zum Abkühlen und Erstarren des Breis mit Handtüchern bedeckt stehen lassen; gebildetes Kondenswasser mit (sterilen) Papiertüchern auswischen (vorteilhaft ist die Verwendung eines Tischventilators an Stelle von Stoff oder Papiertüchern). Anschließend einige Tropfen einer dickflüssigen Frischhefesuspension (Hefe in Wasser) auf die Futteroberfläche geben, mit Stopfen verschließen. Diese fertigen Gefäße können bei Zimmertemperatur 3-4 Tage, im Kühlschrank eine Woche und länger aufbewahrt werden. Wenn das Futter feucht geworden ist, muss evtl. vor Gebrauch ein kleiner Filterpapiertrichter oder -streifen ins Futter gesteckt werden.

3. Kreuzungsgenetik

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist ein beliebter und häufig verwendeter Modellorganismus der klassischen Genetik. Dies basiert unter anderem darauf, dass sie leicht in großen Mengen im Labor zu kultivieren ist und eine relativ kurze Generationszeit von 9 Tagen (bei 25 °C) aufweist.

Es handelt sich um einen **diploiden** Organismus, d. h. alle (oder fast alle) Erbanlagen (**Gene**) liegen im Erbgut doppelt vor. Diese Tatsache macht die Analyse von Erbgängen schwieriger, da nicht - wie bei **haploiden** Organismen - vom **Phänotyp** eindeutig auf den **Genotyp** geschlossen werden kann. Der diploide Charakter hat jedoch einen gravierenden evolutionären und ökologischen Vorteil: Jedes Individuum vererbt zwei Gene (eventuell verschiedene - man spricht dann von **Allelen** des Gens). Das erhöht die kombinatorischen Möglichkeiten im Zusammenhang mit sexueller Vermehrung und ermöglicht damit eine flexiblere Reaktion auf die Umwelt.

Organismen in der freien Natur weisen normalerweise einen einheitlichen Phänotyp auf und lassen auf einen einheitlichen Genotyp schließen. D. h., sehr viele ihrer Gene liegen in identischen Allelen vor, ihr Genotyp ist **homozygot** Wildtyp (Symbol +/+). Spontan, oder im Labor durch Bestrahlung oder Chemikalien ausgelöst, können Veränderungen der Gene (**Mutationen**) auftreten, die zu äußerlich (**phänotypisch**) veränderten Individuen (**Mutanten**) führen. Solche Mutanten-Stämme sind bei *Drosophila* zu tausenden bekannt und werden im Labor gehalten. So erkennt man z.B. die Existenz eines Gens für die Augenfarbe erst dann, wenn dieses Gen mutiert ist und keine Augenfarbstoffe mehr gebildet werden können. Dieses Gen, das als Wildtyp-Allel Augenfarbstoff exprimiert, heißt dann w^+ oder kurz + ($w = white$, weißäugig), als mutiertes Allel (weiße Augen) wird es w genannt.

Im diploiden Genom ergibt sich eine gewisse Konkurrenzsituation, wenn bestimmte Gene in verschiedenen Allelen, z. B. Wildtyp-Allel und Mutante, in einem Individuum vereinigt sind (= **Heterozygotie** oder **Heterozygose**). Entweder setzt sich in der phänotypisch sichtbar werdenden **Expression der Gene** das Wildtyp-Allel durch, dann ist dieses **dominant** und die Mutation **rezessiv**. Das mutierte Gen erhält dann ein Kürzel, das mit einem kleinen Buchstaben beginnt. Ist die Mutation dominant, so erhält das Gen am Anfang einen großen Buchstaben. Gleiche Allele im Genom bedeuten, dass das Individuum **homozygot** ist.

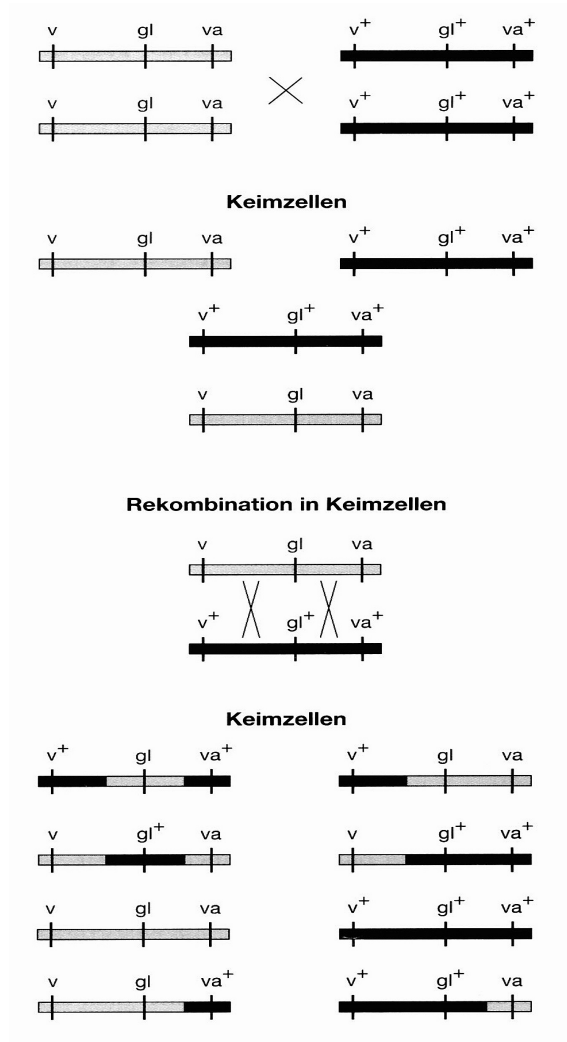
Gene werden nicht völlig unabhängig voneinander vererbt, sie liegen vielmehr auf **Kopplungsgruppen**, deren zytologisches Äquivalent die **Chromosomen** sind. *Drosophila* besitzt im haploiden Satz 4 Chromosomen, davon liegen im diploiden Tier 3 jeweils doppelt und damit homolog vor (= **Autosomen**: Nr. 2-4). Ferner gibt es ein X- (Nr. 1) und ein kleines Y-Chromosom (= **Heterosomen** oder **Geschlechtschromosomen**). Die Kombination X/Y kennzeichnet das Männchen, die Kombination X/X finden wir beim Weibchen. Das bedeutet, dass die meisten Gene des X-Chromosoms beim Männchen weder heterozygot noch homozygot vorliegen können. Sie sind quasi haploid, und diese Situation wird **hemizygot** genannt. Gene auf einem Chromosom (= Kopplungsgruppe) werden nicht grundsätzlich gemeinsam vererbt. Vielmehr kommt es in der **Meiose** (Reduktionsteilung bei der Keimzellenbildung, die zu haploiden Gameten führt; bei *Drosophila* passiert das nur in der Meiose der Weibchen) zum Austausch von Material zwischen homologen Chromosomen, **Crossing-Over** oder **Crossover** genannt. Dadurch können Allele, verglichen mit der Situation bei den Eltern, rekombiniert werden, wie die Abbildung auf der folgenden Seite schematisch zeigt.

Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit, die relativen Abstände verschiedener Gene auf einer **Kopplungsgruppe** zu bestimmen, da **Crossover**-Ereignisse zwischen weit entfernt liegenden Genen statistisch häufiger sein werden als zwischen dicht benachbarten. Die Anzahl phänotypisch sichtbarer Rekombinanten (die also vom parental Phänotyp abweichen) ist dementsprechend ein direktes Maß für den Abstand der untersuchten Gene auf der linearen Kopplungsgruppe.

Zur Bestimmung dieser Abstände werden meist Test-Kreuzungen mit 3 oder mehr Genen gleichzeitig durchgeführt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse führt dann zur **Kartierung der Gen-Loci** (Einzahl: **Locus**). Eine solche Karte wird **rekombinatorisch** oder **meiotisch** genannt, im Gegensatz zur **physikalischen** oder **zytologischen**, die sich aus der Analyse chromosomaler Aberrationen ergibt, die bei Dipteren an den Polytänchromosomen der Speicheldrüsen sichtbar werden.

3.1 Möglichkeiten für Crossing-Over Ereignisse

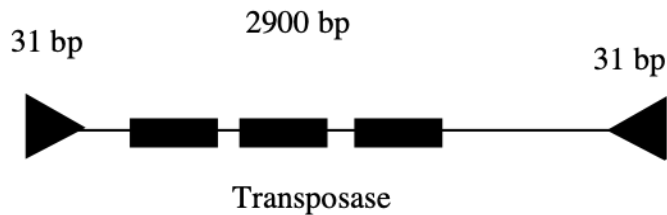
(Nach Henning, Lehrbuch der Genetik, 2. Auflage)



4. P-Elemente in *Drosophila*

4.1 Basisinformationen zum P-Element (Suzuki, S. 533 ff)

Das P-Element von *Drosophila* fällt in die Klasse der Transposons. Es wurde entdeckt, weil es recht häufig die Position im Genom verändert und dadurch Mutationen hervorruft. Diese Mutationen sind durch häufige Revertierbarkeit gekennzeichnet. Eine Besonderheit dieses Transposons ist, dass das "Springen" ausschließlich in der Keimbahn auftritt. Die Klonierung dieses Elementes ergab folgende Struktur: Das vollständige Element ist 2900 Bp lang, verkürzte Formen von 500 - 2900 Bp, die transpositionsinkompetent sind, treten ebenfalls auf. Die Enden sind durch "inverted repeats" (gegenläufige Wiederholungssequenzen) von 31 Bp gekennzeichnet.



Der innere Teil kodiert für eine Transposase, die die 31 Bp "Flügel" zur Transposition ins Genom benutzt. Das Transposase-Gen hat mehrere Introns. Diese Introns werden in der Keimbahn aus der mRNA entfernt, so dass die Transposase translatiert werden kann. Im Soma hingegen wird das 3. Intron nicht aus der mRNA entfernt, so dass ein kleineres Protein entsteht, das durch Akkumulation als Repressor fungiert.

4.2 Das P-Element als Vektor

Aus diesem P-Element hat man einen Klonierungs- und Transformationsvektor für *Drosophila* hergestellt. Um das Transpositionereignis leicht nachweisbar zu machen, hat man in den Vektor neben dem P-Element noch einen Augenfarben-Marker kloniert. Verwendet wurden Fliegen mit der Mutation "white" (weiße Augen), sowie ein Vektor mit dem *white+* (Wildtyp)-Gen. Dadurch erhalten transformierte Fliegen rote Augen. Um hieraus einen stabilen Stamm zu etablieren, in dem es nicht mehr möglich ist, dass das P-Element in nachfolgenden Generationen erneut seinen Integrationsort verlässt (springt), transformiert man die entsprechenden Fliegen mit zwei DNAs.

1. Vektor mit Augenmarker und zu testendem DNA-Fragment (z.B. Promotor). Dieser Vektor hat beide "Flügel" des P-Elements, kann also in das Genom integrieren. Allerdings ist hier noch kein Transposase-Gen vorhanden, welches für eine erfolgreiche Integration notwendig ist. Um die Integration in das Genom dennoch zu ermöglichen, benötigt man demzufolge ein sogenanntes "Helferplasmid".

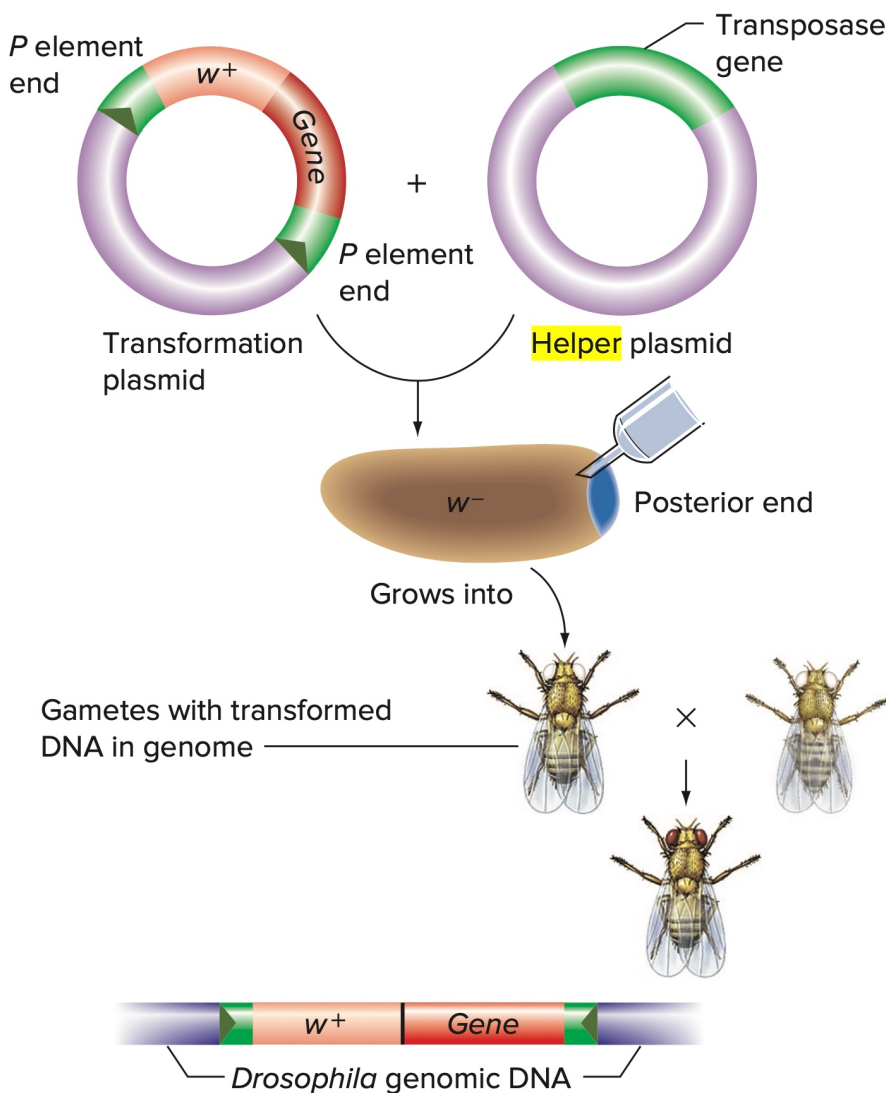
2. $P\pi$ (wc)-Helfer (wc = wings clipped)

Der Helfer kodiert für eine Transposase in *trans*, so dass der Vektor in das Genom integriert werden kann. Da der Helfer selbst nicht integrieren soll, ist bei diesem Plasmid einer der 31 Bp Flügel deletiert, was eine Integration in das Genom verhindert. Dadurch verdünnt sich das Helferplasmid im Zuge der Entwicklung immer mehr bzw. wird abgebaut.

4.3 Herstellung von transgenen *Drosophila*-Stämmen

Wie bereits beschrieben, springt das P-Element nur in der Keimbahn. Im *Drosophila*-Embryo sind Soma und Keimbahn bereits im syncytialen Blastoderm getrennt. In diesem Stadium gibt es keine Zellen, sondern nur Kerne, so dass DNA leichter importiert werden kann. Hier wird DNA mittels Mikroinjektion in *Drosophila*-Embryonen eingebracht. Um zu injizieren wird das Chorion entfernt. Dann klebt man etwa 50 - 100 *Drosophila*-Embryonen (mit dem posterioren Pol an die Kante) auf ein Deckglas und injiziert die DNA unter dem Mikroskop. Bei diesem Vorgang sind die Embryonen mit Voltalef-Öl (Vital-Öl) abgedeckt, so dass sie nicht austrocknen, sich jedoch normal entwickeln können. Nach 24 Stunden schlüpfen Larven, und man lässt diese Tiere zu Imagines heran-

wachsen. Diese Tiere bezeichnet man als G0. Die injizierten G0-Tiere sind eventuell in ihrer Keimbahn transformiert, was natürlich erst in ihren Nachkommen sichtbar wird. Deshalb kreuzt man G0-Tiere mit w/w bzw. w/y Tieren und sucht aus deren Nachkommen die transformierten Fliegen heraus. Diese identifiziert man am *white*-Gen, welches an orange-roten Augen erkennbar ist. Da das *white*-Gen schlechter als an seiner endogenen Position exprimiert wird, sind die Augen meist orange. Wenn man seine erhaltenen transformierten Linien homozygot kreuzen möchte, ist das recht praktisch, da dann die homozygote Situation an dunkleren Augen erkennbar ist.



Aus Hartwell - From Genes to Genomes

5. Experimenteller Teil - Versuchsanleitungen

Versuch 1: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von Reportergenen

Versuch 2.1: Ektopische Expression von subzellulären Markern durch Kreuzung mit Gal4-Treiberlinien

Versuch 2.2: Weiterführende Analyse der Markerproteine mittels Western Blot

Versuch 3: *In situ*-Hybridisierung

Versuch 4: Inverse PCR zur Lokalisierung von P-Elementen

Versuch 5: Expression verschiedener *Drosophila* Proteine in Insektenzellen und weiterführende Analyse mittels Western Blot

Versuch 6: Physiologie und Verhalten von *Drosophila melanogaster*

Experiment 1: Geschlechterverhältnis, Student's t-Test.

Experiment 2: Hell/Dunkelwahrnehmung von Larven.

Experiment 3: Lokomotion von Larven. Vergleich Wildtyp-Mutante. Überprüfen Sie, ob beispielsweise die Mutation Mical zu einem larvalen Lokomotionsdefekt führt. Wenden Sie verschiedene Auswerteverfahren an, bspw. Per Hand oder mittels Tracking-Software.

Experiment 4: Kletterassay (Imagos). Überprüfen Sie, ob beispielsweise die Mutation Mical, Su(z)2 usw. zu einem Kletterdefekt bei Imagos führt.

Experiment 5: Chemotaxis.

Versuch 7: Lipidfärbung an dritten Larven (Ölrot O-Färbung)

Versuch 1: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von Reportergenen

Allgemeine Grundlagen

Die weite Verbreitung immunhistochemischer Methoden in den letzten Jahren wurde begleitet von der Entwicklung einer Vielzahl von Techniken, die auf verschiedenen theoretischen Ansätzen beruhen und eine hohe Spezifität und Sensibilität sicherstellen sollen. Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten Methoden. Bei der sogenannten direkten Methode ist der primäre Antikörper direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff oder an ein Enzym, welches später einen Farbstoff umsetzt, gebunden.

Dem gegenüber stehen indirekte Methoden:

Bei der Zwei-Schritt-Methode ist an diesen sekundären Antikörper ein Fluorochrom oder Goldpartikel gebunden, der direkt visualisiert werden kann. Häufig ist der sekundäre Antikörper auch mit einem Enzym (z.B. Peroxidase) konjugiert, mit dem dann wiederum ein Substrat umgesetzt werden kann.

Bei der Drei-Schritt-Methode wird an den enzymgekoppelten sekundären Antikörper noch mal ein tertiärer Antikörper mit demselben Enzym gebunden. Durch die Aufsummierung von Enzymen kommt es hier zu einer entsprechenden Signalverstärkung. Bei der indirekten Methode wird die Visualisierung also vom sekundären Antikörper und seinem Konjugat erreicht. Die Visualisierung kann hierbei direkt, d.h. ohne weitere Arbeitsschritte erfolgen (Beispiel Fluoreszenz) oder es wird, wie in unserem Versuch, in mehreren Schritten ein Farbsubstrat, z.B. 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) umgesetzt.

Besondere Popularität haben jene Techniken erlangt, die auf der Interaktion von Avidin und Biotin, also auf dem Gebrauch biotinylierter Antikörper beruhen.

Alle Avidin-Biotin Methoden basieren auf vier Grundprinzipien:

1. Der außerordentlich hohen Affinität zwischen Avidin und Biotin, die dazu führt, dass ein Molekül sehr stabil an das andere bindet.
2. Der Möglichkeit Biotin durch eine einfache biochemische Reaktion an größere Moleküle, wie Enzyme oder Antikörper zu koppeln, ohne deren Eigenschaften zu verändern.
3. Der Möglichkeit Avidin mit einer Vielzahl von Markern zu versehen, wie z. B. Enzymen, Schwermetallen oder Fluoreszenzfarbstoffen.
4. Der Fähigkeit des Avidins als Brücke zwischen zwei verschiedenen biotinylierten Molekülen, etwa einem Antikörper und einer Peroxidase, zu dienen.

Chemische Grundlagen

Avidin: Avidin ist ein basisches Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von rund 60 Kilodalton (kDa). Es wird aus rohem Hühnereiweiß isoliert und besteht aus vier Polypeptid-Untereinheiten von je 128 Aminosäuren. Eine entscheidende Charakteristik der Tertiärstruktur des Avidin-Moleküls ist die Anwesenheit von vier hydrophoben Taschen (eine für jede Untergruppe) an der Oberfläche, welche als spezifische Biotin-Bindestellen dienen.

Biotin: Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin H) mit einem Molekulargewicht von 244,31 kDa. Es ist als Wachstumsfaktor in sehr geringen Mengen in jeder Zelle vorhanden und liegt meistens gebunden an Proteine oder Polypeptide vor. Biotin wurde zuerst 1936 aus Eigelb isoliert; eine relativ

hohe Biotinkonzentration findet man auch in Hefezellen, Milch sowie Leber-, Nieren- und Tumorgeweben (Moss et al., 1971).

Biotin bindet mit einer Affinität von mehr als 10^{15} M^{-1} an Avidin und wird dadurch inaktiviert (Liu et al., 1979). Diese nicht kovalente Bindung verläuft sehr schnell und wird als eine der stärksten natürlichen Bindungen betrachtet.

Die meisten Antigen-Antikörper-Bindungen haben beispielsweise nur eine Affinitätskonstante von 10^9 M^{-1} .

Biotinylierung: Als Biotinylierung bezeichnet man das chemische Verfahren, durch das Biotin an eine Vielzahl von Makromolekülen wie Antikörper, Enzyme und Nukleinsäuren gebunden wird. Die geringe Größe des Biotins verhindert, dass dabei die chemischen, immunologischen oder physikalischen Eigenschaften jener Moleküle verändert werden. Darüber hinaus ist sogar eine vielfache Biotinylierung eines Moleküls möglich.

Um die Gefahr einer sterischen Behinderung bei der späteren Bindung des biotinylierten Moleküls an Avidin zu verringern, wird bei Beladung des Makromoleküls an Biotin ein sogenannter "spacer arm" eingeführt. Diese 7 bis 16 Atome langen Moleküle dienen als Brücke zwischen Biotin und dem Makromolekül. Dies erhöht die Anzahl der möglichen Avidin-Bindungen und damit die Sensitivität der Methode.

Markierung des Avidins: Avidin kann mit verschiedenen Markern verknüpft werden, z.B. Fluoreszenzfarbstoffen wie Rhodamin oder Fluorescein, Enzymen wie Phosphatase, Peroxidase oder β -Galaktosidase, oder auch Metallen wie Gold oder Silber.

Bei Anwendung der ABC-Methode ist nur eine Markierung mit Enzymen möglich.

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin 4 HCl (auch 3,3', 4,4'-Tetraaminobiphenyl)

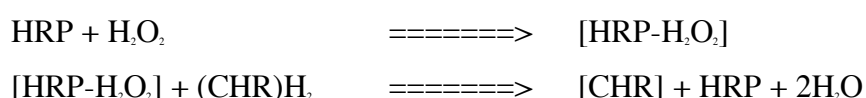
DAB hat ein Molekulargewicht von 396,2 kDa und formt farblose bis rosafarbige, nadelförmige Kristalle. Es ist schwer löslich in organischen Lösungsmitteln, aber bildet in Wasser eine weißliche Lösung.

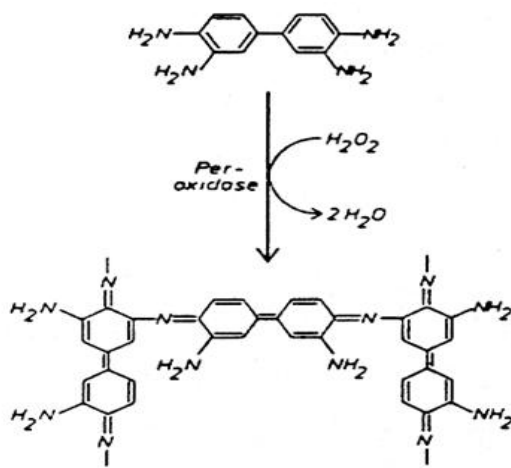
HRP: Horse-Radish-Peroxidase = Meerettichperoxidase Das Enzym HRP ist ein Pflanzenglycoprotein mit einer kovalent gebundenen, eisenhaltigen Hämgruppe als Koenzym. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa.

In einem passenden Medium verbindet sich HRP leicht mit seinem Substrat H_2O_2 . Der resultierende $[\text{HRP-H}_2\text{O}_2]$ Komplex kann eine Vielzahl chromogener ("zu einem Farbumschlag fähiger") Stoffe oxidieren $[(\text{CHR})\text{H}_2]$.

Diese nehmen im oxidierten Zustand eine dunkle Färbung an und wirken als leicht erkennbare Marker für HRP-Aktivität.

An Stellen, die HRP-Aktivität enthalten, laufen zwei Reaktionen ab:





Die Kombination von HRP mit H_2O_2 verläuft schnell und hochspezifisch und es gibt praktisch keine Rückreaktion.

Da der nicht katalysierte Zerfall von H_2O_2 in H_2O sehr viel Energie benötigt, findet keine Oxidation des Chromogens ohne Einwirkung von HRP statt.

Auf der linken Seite ist der Reaktionsmechanismus von DAB mit Peroxidase und H_2O_2 dargestellt. Das entstehende, unlösliche Indaminpolymer wird als braunes Präzipitat sichtbar.

Die indirekte ABC-Methode

1. Das in das *Drosophila*-Genom eingeschleuste Transgen exprimiert bakterielle β -Galaktosidase oder GFP.
2. Ein Antikörper gegen die β -Galaktosidase oder GFP (hergestellt in Mäusen) bindet an das entsprechende Protein.
3. Avidin verbindet sich mit der biotinylierten Meerrettichperoxidase zu einem Komplex, bei dem einige Biotin-Bindestellen am Avidin frei bleiben. Über diese lagert sich der bis zu mehreren Stunden stabile Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper an. Es findet also eine Verstärkung der Enzymreaktion statt.
4. Ein Sekundärantikörper - ein biotinyliertes Anti-Maus Immunglobulin - ist spezifisch für Maus IgGs und erkennt den Primärantikörper als sein Antigen und bindet daran.
5. Das gekoppelte Chromogen (DAB) wird durch Zugabe von H_2O_2 irreversibel oxidiert, was durch einen Farbumschlag sichtbar wird.

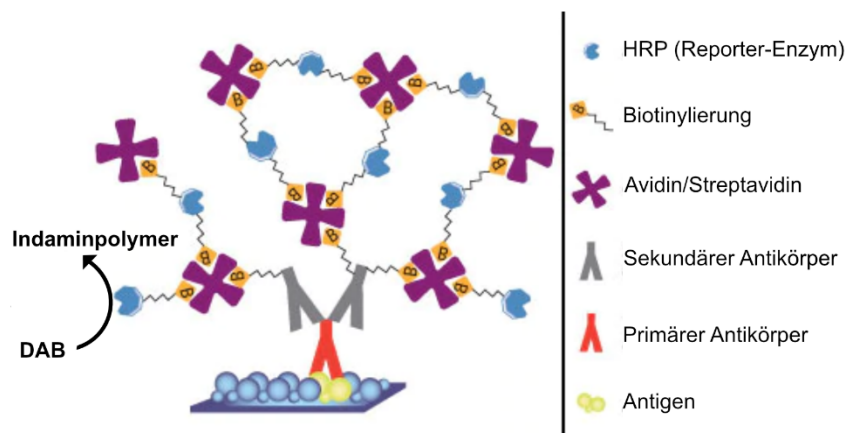


Abbildung verändert nach „<https://www.thermofisher.com/>“

Literaturverweise:

- Coggi G, Dell'Orto P, Viale G (1986): Avidin-Biotin Methods.
 In: Polack JM, Van Norden S, ed.: *Immunocytochemistry*, 54-70.
- Hsu SM, Raine L, 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.
- Warnke R, Levy R (1980): Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: an avidin-biotin-horseredish peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 771-776.

Versuchsdurchführung

Benötigte Materialien:

- Embryonen von verschiedenen Reporterlinien (*handC*-GFP; *tnn*-GFP; *odd*-LacZ; *seven-up*-LacZ; *pl61*-LacZ)
- TNX, PBS und PBT
- Klorix : Wasser (1:1)
- Methanol, Ethanol
- Antikörper (anti-βGal (1:2000) und anti-GFP (1:500), hergestellt in Maus, und anti-Maus (1:200), Biotin-gekoppelt)
- 1x Roti-Block
- Lösung A und B
- Färbelösung (pro Cup):
 - 600 µl PBS
 - 30 µl 1% NiCl
 - 12 µl DAB (25 mg/ml)
- 0.3 % H₂O₂
- Einbettmedium

Allgemeines: Beim Waschen sollte man darauf achten, dass alle Embryonen abgesunken sind, bevor man den Alkohol oder das PBT absaugt. Andernfalls verliert man bei jedem Pipettierschritt einige der Embryonen.

1. Woche:

Fliegenablagen ansetzen: Für die Antikörperfärbungen werden Embryonen verwendet, die 0-24 h alt sind. Dazu benötigt man zunächst eine Fruchtsaft-Ablageschale, die mit **etwas** Hefe bestrichen wird. Dann werden adulte Fliegen auf Ablageglocken geklopft (**pro Linie eine Glocke!**). Diese Glocken werden mit einer Fruchtsaftablagenschale verschlossen und mit der Ablageschale nach unten bei Raumtemperatur stehen gelassen. **Beschriftung auf der Ablageschale nicht vergessen!**

Der Vorgang wird täglich nach ca. 24 h wiederholt. Die Ablageschalen werden bei 4°C gelagert, um eine weitere Entwicklung der Embryonen weitgehend einzuschränken.

Embryonen sammeln: Von den Ablageschalen werden die Embryonen mit TNX durch abreiben mit einem Pinsel abgespült und mit einer Einmal-Pasteurpipette in ein Netzchen überführt (**für jede Linie ein Netzchen!**).

(Klorix, Formaldehyd und Methanol sind reizend und/oder giftig)

Dechorionisieren + Fixieren: Die Netzhchen in eine Petrischale mit Wasser:Klorix (1:1) überführen und unter dem Binokular beobachten: dechorionisierte Embryonen glänzen und schwimmen an der Oberfläche.

In der Zwischenzeit die Fixierlösung im Eppi (**für jede Linie eines!**) ansetzen:

125 μ l 16 % methanolfreies Formaldehyd

375 μ l PBS

500 μ l Heptan

Die dechorionisierten Embryonen mit einem Pinsel in das entsprechende Eppi überführen. Auf dem Schüttler für 25 Minuten inkubieren. Anschließend die Formaldehyd-Phase (unten) abpipettieren – Embryonen, die nicht an der Phasengrenze schwimmen, sondern abgesunken sind, werden mit abgesaugt.

Devitellinisieren: Zu jedem Eppi 500 μ l Methanol zugeben, gut verschließen und kräftig in der Hand für 2 Minuten schütteln; dann die Embryonen absinken lassen. Überstand (mit den schwimmenden Embryonen) verwerfen. Abgesunkene Embryonen mit 500 μ l Methanol waschen Anschließend 1 x kurz und 2 x für 5 min auf dem Schüttler in je 300 μ l Ethanol waschen. In frischem Ethanol bei - 20°C lagern oder direkt weiter verwenden.

Antikörperfärbung

Tag 1:

1. Antikörperinkubation (anti- β -Gal aus Maus, 1:2000 / anti-GFP aus Maus 1:500): Die Embryonen befinden sich in Ethanol und müssen zunächst rehydriert werden. Dazu werden sie 2 x kurz, dann noch 3 x etwa 10 min auf dem Schüttler mit je 500 μ l PBT gewaschen. Das PBT wird komplett abgesaugt und 100 μ l der Erstantikörperlösung hinzu gegeben. Der Antikörper inkubiert über Nacht (ON) bei 4°C (kann auch mehrere Tage inkubieren, z.B. übers Wochenende).

Tag 2:

2. Antikörperinkubation: Der Erstantikörper wird abgesaugt und **aufgehoben** (!!). 2 x kurz, 3 x 10 min unter Schütteln mit 500 μ l PBT waschen. Anschließend wird für 20 min auf dem Schüttler in 500 μ l 1x Roti-Block in PBS geblockt. Die Blockierlösung absaugen und verwerfen. Dann 100 μ l des biotinylierten Zweitantikörpers zugeben (anti-Maus, biotinyliert in 1:500-Verdünnung). Der 2. Antikörper inkubiert ebenfalls bei 4°C ON. (Faustregel: 2. Antikörper nicht länger als 1. Antikörper inkubieren!)

Tag 3:

Färbereaktion: Der Zweitantikörper wird abgesaugt und ebenfalls **aufgehoben**. Die Embryonen werden wie zuvor in PBT gewaschen (2 x kurz, 3 x 10 min). Parallel wird der AB-Komplex (Avidin-Biotin) vorbereitet: Pro Linie werden je 2 μl von Lösung A und Lösung B in 100 μl PBS pipettiert und gemischt. Anschließend wird der Ansatz 30 min bei RT stehen gelassen. Danach werden je 104 μl des Komplexes auf die gewaschenen Embryonen pipettiert und 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Erneut mit PBT waschen (wie zuvor).

Parallel hierzu sollte die Färbelösung vorbereitet werden; pro Cup: 600 μl PBS + 30 μl 1% NiCl + 12 μl DAB (25 mg/ml).

Achtung: DAB ist giftig! Alle Schritte mit Färbelösung nur mit Handschuhen durchführen! Alle Materialien (Spitzen, Eppis, PBT, usw.), die mit DAB in Kontakt kommen, müssen mit Klorix behandelt werden, um das DAB zu inaktivieren!

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der AB-Komplex abgenommen, die Färbelösung auf die Embryonen pipettiert und mit diesen zusammen in ein Blockschälchen transferiert. Durch Zugabe von 5 μl 0.3 % H_2O_2 wird die Färbereaktion gestartet (unterm Binokular beobachten!).

Ist die Färbung eindeutig genug, wird alles zurück in das Eppi transferiert und dreimal kurz mit PBT gewaschen, um die Färbereaktion zu stoppen. Die Färbelösung und die erste Waschlösung bitte in Klorix entsorgen (s.o.)!

Einbetten: Einige Embryonen auf einen Objektträger geben und eine kleine Menge Einbettmedium darauf tropfen. Anschließend werden die Embryonen mit einer sauberen Pipettenspitze gleichmäßig verteilt und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Die erhaltenen Ergebnisse werden mittels Hellfeld-Mikroskopie dokumentiert.

Versuch 2: Expression von fluoreszierenden Reportergenen in *Drosophila melanogaster* (UAS/Gal4 System)

1. Grundlagen

Zur Expression von Transgenen (künstlich eingebrachte DNA) verwendet man in *Drosophila* häufig das binäre UAS/Gal4 System (siehe Vorlesung). Dieses Expressionssystem wurde ursprünglich aus der Hefe adaptiert.

Für den Versuch benötigt man zwei transgene Fliegenstämme (Abbildung 1). Zum einen die so genannte **Treiberlinie**. Diese exprimiert den Transkriptionsfaktor Gal4 unter der Kontrolle definierter regulatorischer DNA Sequenzen (*enhancer*) in bestimmten Zell- und Gewebetypen. Gal4 ist ein so genannter Zinkfinger Transkriptionsfaktor, welcher in der Lage ist bestimmte DNA Sequenzen (*upstream activating sequences* - UAS) zu binden. Nachdem Gal4 die UAS gebunden hat, rekrutiert es Komponenten der DNA Transkriptionsmaschinerie, und ist somit in der Lage die DNA-Transkription zu starten. Diese Aktivierung funktioniert in allen bisher getesteten Eukaryonten. Da Gal4 aber gleichzeitig eine hohe Spezifität für die UAS aufweist, und man diese nur in Hefen findet, hat der Transkriptionsfaktor selbst (fast) keine Zielgene in anderen Organismen. Damit hat die Expression von Gal4 allein, keine Auswirkung auf die Funktion von Zellen oder die Entwicklung von Organismen. Zum anderen benötigt man eine so genannte **Effektor-Linie**. Dieser Fliegenstamm, enthält ein Transgen unter der Kontrolle mehrerer UAS (Abbildung 1). Diese können in *Drosophila* (fast) nur von Gal4 gebunden werden. Damit ist die Expression des unter der UAS stehenden Gens nur in Zellen möglich, welche auch Gal4 exprimieren. Man spricht hier von einer zellautonomen Wirkweise.

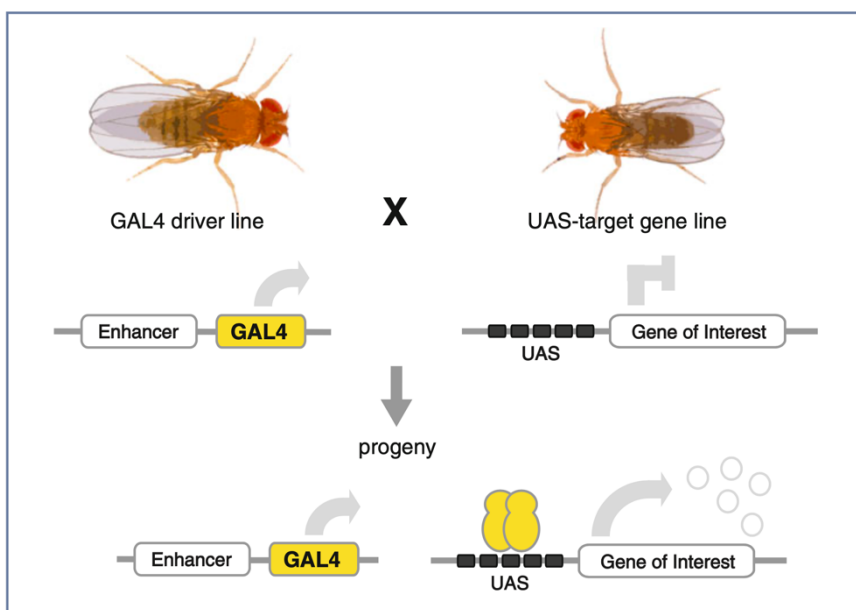


Abbildung 1 - Schematische Darstellung des UAS/Gal4 Systems. Gal4 wird von einem endogenen *Enhancer* zeit- und gewebespezifisch exprimiert. Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher wiederum an *upstream activating sequences* (UAS) binden kann, und dadurch die Transkription eines beliebigen Gens (im Kurs verschiedene FPs) aktiviert (Caygill and Brand, 2016).

Nur in den Nachkommen (F1-Generation) einer Kreuzung aus Treiber- und Effektorstamm wird das UAS-Konstrukt aktiviert, was im Falle eines letalen Konstruktes einen entscheidenden Vorteil bietet. Darüber hinaus ist eine Kombination von verschiedenen Treibern, die in Stammsammlungszentren in großer Zahl verfügbar sind, mit ein und derselben UAS-Linie möglich. Auf der anderen Seite kann man natürlich auch unterschiedliche UAS-Linien mit einer definierten Treiberlinie kreuzen.

Die UAS-Linie bestimmt also was exprimiert wird; die Gal4-Linie bestimmt wann und wo dies geschieht!

2. Ziel des Versuches

In diesem Versuch sollen mit Hilfe des UAS/Gal4 Systems verschiedene Fluoreszenzproteine in dritten Larven exprimiert werden. Diese Proteine unterscheiden sich sowohl in ihren optischen Eigenschaften (GFP,

mCherry, Venus), als auch in der Lokalisierung der Protein innerhalb der Zelle (Zellmembrane, Golgi, Mitochondrien etc.). Ziel des Experimentes ist es die Lokalisierung eines bestimmten Proteins in drei verschiedenen Geweben mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen, und die Morphologie der jeweiligen Organellen/Kompartimente zu beschreiben.

3. Durchführung

Benötigte Materialien:

2. virginelle Weibchen der Gal4-Linien
3. adulte Männchen der UAS-Effektrolinien (Fluoreszenzproteine)
4. kleine Zuchtgefäße zum Aufbewahren und Verkreuzen der virginellen Weibchen
5. feine Pinzetten
6. Pinzel
7. kleine Petrischale (Plastik) zum Betäuben der Larven
8. Eis
9. Objektträger mit Deckgläschen (18 x 18mm und 20 x 40 mm)
10. 80% Glycerol (zum Einbetten der Quetschpräparate und präparierten Organe)
11. Tesafilm (zum Befestigen der Deckgläschen)
12. Fluoreszenzmikroskop
13. Ether, Betäubungseinheiten und Stereomikroskop zum Sortieren der Fliegen

Fliegenstämme:

Tabelle 1 - Gal4 Stämme die im Kurs zur Verfügung stehen. Es werden Weibchen benötigt.

Gal4 Stämme (einfach)	Expression in Larven
<i>mef2</i> -Gal4	Muskulatur
<i>prc</i> -Gal4	Fettkörper
<i>sgs</i> -Gal4	Speicheldrüsen

Tabelle 2 - UAS Effektorstämme, welche die Expression verschiedener Fluoreszenzprotein erlauben. Es werden Männchen benötigt

UAS Stämme	FP und Lokalisierung
UAS-mCherry::NLS	mCherry (rot), Zellkern
UAS-KDEL::RFP	RFP (rot), endoplasmatisches Retikulum
UAS-mCherry:CAXX.S	mCherry (rot), Plasmamembran
UAS-mCD8::EGFP	EGFP (grün), Plasmamembran
UAS-Koi::EGFP	EGFP (grün), Kernmembran
UAS-Venus::GAP43	Venus (gelb), Plasmamembran
UAS-mito::EGFP	EGFP (grün), Mitochondrien

Durchführung:

Erste Woche:

Für den Versuch müssen zuerst virginelle (jungfräuliche) Weibchen der Gal4-Treiberlinien (**Tabelle 1**) gesammelt, und anschließend mit Männchen verschiedener UAS-Effektorlinien (**Tabelle 2**) gekreuzt werden (P-Generation). Die Nachkommen (F1-Generation) sollen anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Dafür werden die Tiere entweder präpariert, oder können als „Quetschpräparat“ direkt ausgewertet werden (je nach Gewebe).

Virginelle Weibchen sammeln: **An jedem Kursmorgen** der ersten Woche werden zunächst die Flaschen mit den Gal4-Linien auf frisch geschlüpfte Weibchen überprüft (**Stämme in Tabelle 1**). Virginelle Weibchen können von älteren Tieren durch ihr äußeres Erscheinungsbild gut unterschieden werden (wird im Kurs

nochmal gezeigt). Junge Weibchen, zeigen ein vergrößertes Abdomen und sind meist deutlich heller als ältere Tiere. Zudem ist häufig der Darm der virginellen Weibchen schwarz eingefärbt (*Mykonium* = *larvaler Kot*). Um die Tiere zu betrachten und sortieren zu können, werden die Fliegen aus der Flasche geklopft und mit Ether betäubt (**Bitte arbeiten Sie unter einem Abzug! Ether ist stark flüchtig, leicht entzündlich, hat einen unangenehmen Geruch und ist gesundheitsschädlich.**). Die virginellen Weibchen werden anschließend mit einem Pinsel unter dem Stereomikroskop aussortiert und in kleinen Flaschen aufgehoben. Bitte achten Sie darauf, dass die betäubten Weibchen nicht den Futterbrei berühren, da sie sonst kleben bleiben. Die Flaschen müssen anschließend **komplett** frei von adulten Tieren sein! Im Laufe des Tages werden zweimal geschlüpfte Weibchen gesammelt: Einmal mittags, einmal abends. Dabei können alle Weibchen als virginell eingestuft werden, da die Spermien von frisch geschlüpften Männchen erst nach 6-8 Stunden gereift sind (Voraussetzung: Am Morgen sind alle adulten Tiere aus der Flasche entfernt worden!)

Verpaarung: Am Mittwoch der ersten Woche werden die virginellen Weibchen der Gal4-Linien, mit Männchen der jeweiligen UAS-Linien verpaart. Dafür werden mehrere Weibchen und Männchen mit Ether betäubt und auf kleine Zuchtgefäße zusammen gesetzt. Achten Sie bitte erneut darauf, dass die betäubten Tiere noch nicht das Futter berühren. Sie können sonst kleben bleiben und werden sich nicht paaren. Über die nächsten Stunden werden sich die Tiere dann verpaaren, und die Nachkommen der F1-Generation beginnen sich zu entwickeln (Abbildung 2). In diesem Zusammenhang ist darauf zu achten, dass mehrere individuelle Kreuzungen angesetzt werden, und dass pro Kreuzung jeweils nur eine UAS- und eine Gal4-Linie eingesetzt wird.

Zweite Woche:

Ab Dienstag der zweiten Wochen (also ca. 120h nach Ansetzen der Kreuzung) werden die kleinen Flaschen mit den verpaarten Fliegen auf das Vorhandensein dritter Larven hin untersucht. Je nach Gewebe, müssen die Tieren vor dem Mikroskopieren ggf. präpariert werden. Das heißt, dass die jeweiligen Gewebe aus dem Tier isoliert werden müssen um beobachtet werden zu können.

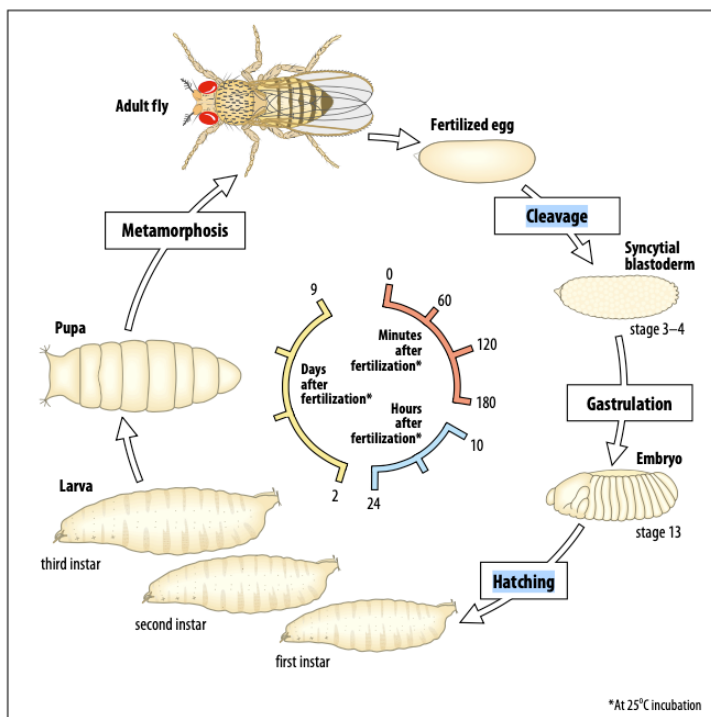


Abbildung 2 - Lebenszyklus von *Drosophila* und ungefähre Entwicklungsdauer bei 25°C. Nach ca. 120h (5 Tage) Entwicklungszeit sind die ersten Tiere der F1-Generation im gewünschten Larvenstadium (3. Larve).

Quelle: Wolpert, Tickle and Martinez-Arias, 2019
- Principles of Development, 6th Edition

Präparation der Larven: Die Gewebe, welche die jeweiligen Fluoreszenzproteine exprimieren, werden als sogenannte „Frischpräparate“ vorbereitet, und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und dokumentiert. Die Vorbereitung und Mikroskopie der Proben erfolgt versuchsbegleitend in der zweiten Woche (Dienstag bis Freitag).

Zur Präparation von Geweben werden die Tiere zuerst mit einem Pinsel gesammelt und in eine kleine Plastikpetrischale überführt. Die Schale wird anschließend für ca. 5 min auf Eis gestellt. Dadurch werden die Tiere betäubt, was das weitere Arbeiten stark erleichtert (Betäuben Sie immer nur so viele Larven wie Sie auch bearbeiten können.). Gehirn und/oder Imaginalscheiben werden dann mit feinen Pinzetten isoliert (wird im Kurs demonstriert). Die Gewebeproben werden in einem Tropfen 80% Glycerol auf einen Objektträger gebracht und dann mit einem Deckgläschen eingebettet. Die Proben sollten so schnell wie möglich (innerhalb von ca. 30 min) am Mikroskop betrachtet werden.

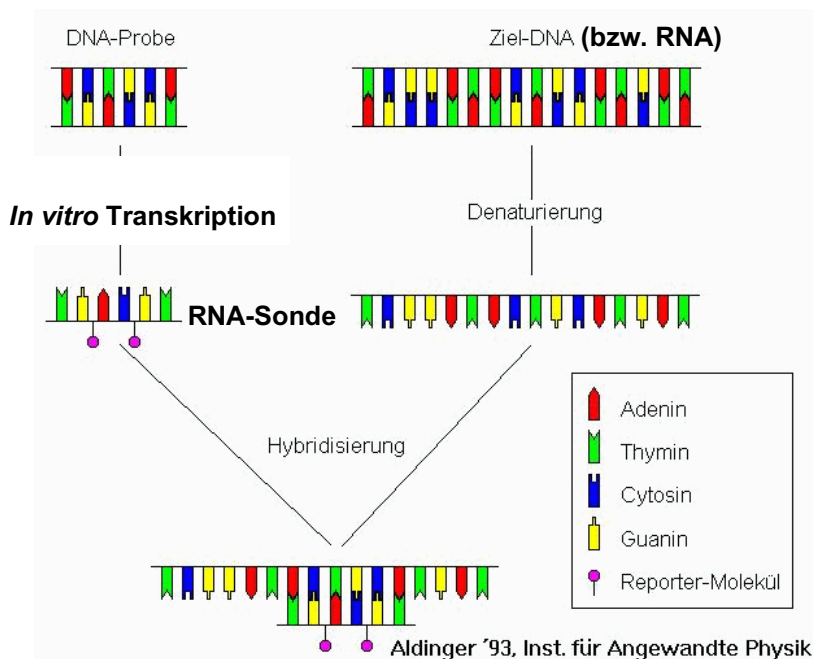
Quetschpräparate: Für die einige Proben ist eine Präparation einzelner Organe nicht unbedingt notwendig. Die Larven sind relativ transparent, wodurch besonders Zellen und Gewebe die sich direkt unter der Cuticula befinden (z.B. Muskeln) direkt beobachtet werden können. Für die Herstellung der Quetschpräparate werden die Tiere zuerst wie oben beschrieben auf Eis betäubt. Einzelne Larven werden dann mit einer feinen Pinzette in einen Tropfen 80% Glycerol auf einen Objektträger überführt. Anschließend muss das Tier mit einer Pinzette oder einem Pinsel grob ausgerichtet werden, um die gewünschten Zellen beobachten zu können (fragen Sie nach wenn Sie sich unsicher sind). Zum Schluss werden die Larven mit einem großen Deckglas (20 x 40mm) vorsichtig eingebettet, und das Deckgläschen mit Tesafilm links und rechts fixiert. Vor dem Festkleben kann durch vorsichtiges Schieben des Deckgläschens die Lage und die Orientierung der Larve nochmals nachgebessert werden. Am Ende sollen die Tiere leicht gequetscht **aber nicht zerquetscht** werden. Sie werden sicherlich einige Anläufe brauchen um den richtigen Druck zu finden. Anschließend müssen die Tiere sofort am Mikroskop betrachtet werden.

Versuch 3: In situ-Hybridisierung

Allgemeine Grundlagen

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung (ISH) lassen sich Nukleinsäuren, also DNA oder RNA, in der Zelle sowohl am histologischen Schnittpräparat als auch im kompletten Organismus (whole-mount) nachweisen. Bei der ISH werden einzelsträngige Nukleinsäuren, die mit einer Markierung versehen wurden, als so genannte **Sonden** eingesetzt. Für diese Art der Detektion finden sowohl DNA- als auch RNA-Stränge Verwendung. Wichtig ist, dass die Sonde die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA oder -RNA aufweist, da sie nur so in der Lage ist, spezifisch an die Zielstruktur zu binden, wobei auch eine Interaktion zwischen DNA und RNA möglich ist. Die Bindung eines Nukleinsäure-Stranges an einen komplementären Strang nennt man Hybridisierung. Anhand der Markierung kann dann mit Hilfe von Antikörpern, die an diese Markierung spezifisch binden, die Sonde *in situ* lokalisiert werden. Die Prinzipien ähneln dabei denen aus der Immunhistochemie. Da an eine markierte Sonde zahlreiche Antikörper binden können, führt der Einsatz dieser Antikörper zu einer erheblichen Signalverstärkung.

In diesem Praktikum sollen mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung die Expressionsmuster der *Drosophila*-Gene "*hand*" (Transkriptionsfaktor) und "*neprilysin4*" (Peptidase) ermittelt werden.

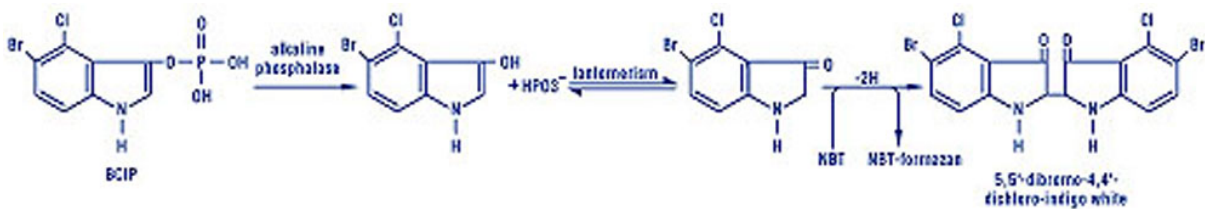


Sowohl die Spezifität der Hybridisierung, d.h. die Frage, ob der markierte Strang wirklich nur an die komplementäre Zielstruktur bindet, als auch die Geschwindigkeit der Reaktion werden von verschiedenen Parametern beeinflusst. Vor und während der Hybridisierung müssen Einflussgrößen wie Sondenkonzentration, Blockierzeit oder Hybridisierungstemperatur so aufeinander abgestimmt werden, dass am Ende ein möglichst kräftiges und spezifisches Signal sichtbar wird. Die Spezifität wird dabei in erster Linie durch die Höhe der Hybridisierungstemperatur gesteuert.

Die Sonden können sehr unterschiedlich markiert werden. Es gibt Verfahren, bei denen nur eine Markierung pro Sondenmolekül erfolgt. Mit anderen Markierungsreaktionen werden mehrere Label in die Sonde eingebaut. Gebräuchliche Markierungen sind:

- der Einbau von Biotin- oder Digoxigenin-Gruppen
- die direkte Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen
- der Einbau radioaktiver Nukleotide (z.B. Tritium (^3H) oder Schwefel-35 (^{35}S))

In diesem Praktikumsversuch werden die verwendeten RNA-Sonden während ihrer Synthese mit Digoxigenin markiert, wobei diese Markierung durch den Einbau von DIG-11-UTP anstelle von UTP erreicht wird. Im Anschluss an die Hybridisierung kann die DIG-Markierung und somit die Position der Sonde mit Hilfe spezifischer Antikörper, die ihrerseits mit dem Enzym "Alkalische Phosphatase" gekoppelt sind, sichtbar gemacht werden. Die endgültige Visualisierung erfolgt durch die Umsetzung eines zugegebenen chemischen Substrats (NBT / BCIP) zu einem schwarz-violetten, unlöslichen Präzipitat. Katalysiert wird diese Reaktion durch die bereits erwähnte "Alkalische Phosphatase". Die Anhäufung dieses Präzipitats in den jeweiligen Zellen kann mit Hilfe eines Binokulares beobachtet werden.



Versuchsdurchführung

Synthese einer RNA-Sonde

Die Synthese von RNA-Sonden (Riboprobes) basiert im Wesentlichen auf der sogenannten *in vitro* Transkription. Wie die Bezeichnung bereits vermuten lässt, handelt es sich hierbei um die Transkription (das Umschreiben) von vorgegebenen DNA-Sequenzen in entsprechende RNA-Stränge. Die Substitution von unmarkierten durch markierte Nukleotide (Digoxigenin-Konjugate) führt dazu, dass als Reaktionsendprodukt markierte RNA-Stränge entstehen, die nun für weitere Anwendungen wie *in situ*-Hybridisierungen oder Northern Blots zur Verfügung stehen.

Im Falle dieses Praktikums sollten nach Abschluss der Synthesen Sonden gegen die Gene "*hand*" bzw. „*neprilysin 4*“ in Digoxigenin-markierter Form vorliegen.

Zur Synthese dieser Sonden ist es zunächst nötig, die Sequenzen, an denen die Sonden letztendlich hybridisieren sollen, mittels PCR zu amplifizieren.

Für den korrekten Ablauf der PCR sollte Folgendes zusammen pipettiert werden:

Stoff	Volumen
5X PCR-Puffer	10 µl
dNTP-Mix + Taq-Polymerase	4 µl
Primer-Mix	2 µl
Vektor-Template	1 µl
H ₂ O _{dest}	33 µl
(DNA-Polymerase (NEB One Taq))	(0,125 µl)

Das anzuwendende PCR-Temperaturprofil gliedert sich wie folgt:

Prozess	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	30 s
Denaturierung	94°C	15 s 39x
Annealing	58°C	20 s 39x
Elongation	68°C	60 s 39x
Finale Elongation	68°C	5 min

Im Anschluss an die PCR werden die kompletten Ansätze bei 100 V einer Gelelektrophorese unterzogen und dann auf einen LED-Tisch transferiert, wo die ihrer Größe entsprechend getrennten DNA-Fragmente mittels entsprechender Anregung sichtbar gemacht werden können (Gel-Red Färbung). Im Idealfall sollte lediglich eine deutliche DNA-Bande zu erkennen sein, die genau der erwarteten Größe der PCR-Amplifikate entspricht ("*hand*": 525 Basenpaare; "*neprilysin4*": 1500

Basenpaare). Diese Fragmente werden mit Hilfe eines Skalpell möglichst sauber herausgetrennt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend aus dem Gel heraus eluiert.

Die Elution aus dem Gel erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

1. Geben Sie 400 μ l Binde-Puffer (GB) zu dem Gelstück
2. Lösen Sie die Gelmatrix bei 55 °C im Thermoschüttler auf (5-10 min)
3. Geben Sie 250 μ l Isopropanol hinzu und mischen Sie den Ansatz
3. Pipettieren Sie davon 750 μ l in eine der ausgeteilten Säulen
4. Zentrifugieren sie den Ansatz 30 sec bei 12.000 x g
5. Verwerfen Sie den Durchlauf und geben Sie 700 μ l Waschpuffer auf die Säule; zentrifugieren Sie den Ansatz erneut (30 sec bei 12.000 x g)
6. Verwerfen Sie den Durchlauf und zentrifugieren Sie den Ansatz erneut (2 min bei 12.000 x g). Dieser Schritt ist essentiell, da dadurch die Säule getrocknet wird.
7. Transferieren Sie die Säule in ein neues, sauberes Reaktionsgefäß und geben Sie 30 μ l H₂O mittig auf die Säulenmatrix. Warten Sie 1 min und zentrifugieren Sie erneut (1 min, 12.000 x g)
8. Das erhaltene Eluat enthält die aus dem Gel herausgelöste DNA
9. Das Eluat wird nun in einer „SpeedVac“ auf 7 μ l ankonzentriert

Ligation

Im nächsten Schritt wird die DNA in den Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert.

Hierfür sollte folgendes in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert werden:

- 1 μ l 10 x Ligationspuffer
- 1 μ l Ligase
- 1 μ l Vektor
- 7 μ l DNA (eingesengtes Eluat)

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und über Nacht bei 15°C inkubiert.

Transformation

An die Ligation schließt sich die Transformation, also das Einschleusen der Vektoren in Bakterienzellen, an.

- Ligationsansatz mit 50 μ l chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen versetzen
- 30 min lang auf Eis inkubieren
- 30 sec Inkubation bei 42 °C (Hitzeschock: Während dieser Zeit gelangen die Vektoren in die Zellen)
- Erneute Inkubation auf Eis (5 min)
- 1 ml LB-Medium zugeben und für 45-60 min bei 37 °C im Schüttler inkubieren
- Zellen kurz abzentrifugieren (3 min, 3000 x g)

- Zellen im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsplatten (LB-Ampicillin), die zuvor mit 8%igem X-Gal (25 μ l) und 1M IPTG (10 μ l) versetzt wurden, austreichen.

Am nächsten Morgen können die Zellen, die einen leeren Vektor aufgenommen haben (blaue Kolonien) von jenen unterschieden werden, die auch das Insert tragen (weiße Kolonien).

Die weißen Kolonien werden in 5 ml LB-Flüssigmedium überführt, das 100 μ g/ml Ampicillin enthält, und über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

Plasmidisolierung

Um zu überprüfen, ob die während der Transformation in die Zellen eingeschleusten Plasmide die gewünschten DNA-Sequenzen auch tatsächlich enthalten, werden sie aus den transformierten Zellen, wie im Folgenden beschrieben, wieder isoliert.

1. Abzentrifugieren der ü. N. Kultur (3 ml, 2 min, 3000 x g)
2. Resuspension des Pellets in 200 μ l P1
3. Zugabe von 200 μ l P2 (alkalische Lyse); mischen erfolgt durch Invertieren
4. Zugabe von 280 μ l P3 (Neutralisierung, Ausfällung); erneut invertieren
5. Abzentrifugieren des Präzipitats: 10 min, 12.000 x g
6. Transferieren Sie den Überstand vorsichtig in die ausgeteilten Säulen
7. Zentrifugation der Säulen: 1 min, 12.000 x g, Durchlauf (DI) verwerfen
8. Zugabe von 500 μ l Waschpuffer; Zentrifugation (1 min, 12.000 x g), DI verwerfen
9. Erneute Zentrifugation zum Trocknen der Säule (2 min, 12.000 x g)
10. Säule in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
11. Zugabe von 50 μ l H₂O (mittig auf die Säulenmatrix)
12. Zentrifugation: 1 min, 5000 x g

Der Durchlauf enthält die gereinigte Plasmid-DNA und wird im Folgenden für einen Restriktionsverdau, der die Identität der Plasmide bestätigen soll, eingesetzt.

Restriktionsverdau

Um zu bestätigen, dass die isolierten Plasmide die gewünschte DNA-Sequenz während der Ligation auch tatsächlich aufgenommen haben, werden sie im nachfolgenden Schritt einem Verdau mit Restriktionsendonukleasen unterzogen. Hierbei sind die Enzyme so gewählt, dass das Insert komplett aus dem Vektor herausgeschnitten werden soll, so dass auf einem Agarosegel sowohl der leere Vektor als auch das Insert komplett zu sehen sein müssten.

Für den Restriktionsansatz sollte Folgendes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert werden:

5 μ l aus der Plasmidpräparation, 1 μ l 10 x Puffer, 1 μ l Enzym (EcoRI), 3 μ l H₂O

Der Ansatz wird nun 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen. Als positiv identifizierte Präparationen werden weiterverwendet.

Um festzustellen, in welcher Orientierung das Insert in den Vektoren vorliegt, wird jeweils eine als positiv identifizierte Plasmidpräparation als PCR-Template eingesetzt. Die Kombination aus einem Vektor- und einem Insertprimer gibt Aufschluss über die Orientierung des Inserts.

Im Anschluss wird die jeweilige Plasmidpräparation so verdaut, dass nach der Restriktion das Umschreiben der DNA vom 3'-Ende des Inserts her möglich ist.

Für den Prozess des Umschreibens, die sogenannte *in vitro*-Transkription, sollte folgendes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert werden:

2 µl 10x Transkriptionspuffer

2 µl Dig-NTPs

2 µl RNA-Polymerase

1 µl RNase-Inhibitor

13 µl linearisiertes Plasmid

Die Reaktion findet nun für 2h bei 37 °C statt und wird im Anschluss daran durch die Zugabe von 2 µl EDTA (200 mM) gestoppt. Um die synthetisierte RNA aus der Lösung auszufällen werden dem Ansatz 2,4 µl Lithiumchlorid (4 M) und 75 µl eiskalter Ethanol (abs.) zugegeben. Die Lagerung des kompletten Ansatzes bei -20 °C über Nacht führt zu einer annähernd vollständigen Fällung der RNA.

Die ausgefällte RNA wird mittels Zentrifugation (14000 x g, 15 min) pelettiert, mit 50 µl Ethanol (70 %ig) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend getrocknet. Das Pellet wird nun in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Bestimmung der Sondenkonzentration

Um in der *in situ*-Hybridisierung eine angemessene Sondenmenge (4 µg / ml) einsetzen zu können, muss zunächst die Konzentration der Sonden bestimmt werden. Hierzu werden 2 µl abgenommen, mit 98 µl Wasser versetzt und die Extinktion bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Als Eichwert wurden zuvor 100 µl reines Wasser gemessen. Aus dem erhaltenen Wert kann mit Hilfe folgender Formel die RNA-Konzentration bestimmt werden:

$$\frac{\text{Gemessener Wert}}{0,025} \times \text{Verdünnung}$$

Der berechnete Wert gibt die RNA-Konzentration in ng / µl an.

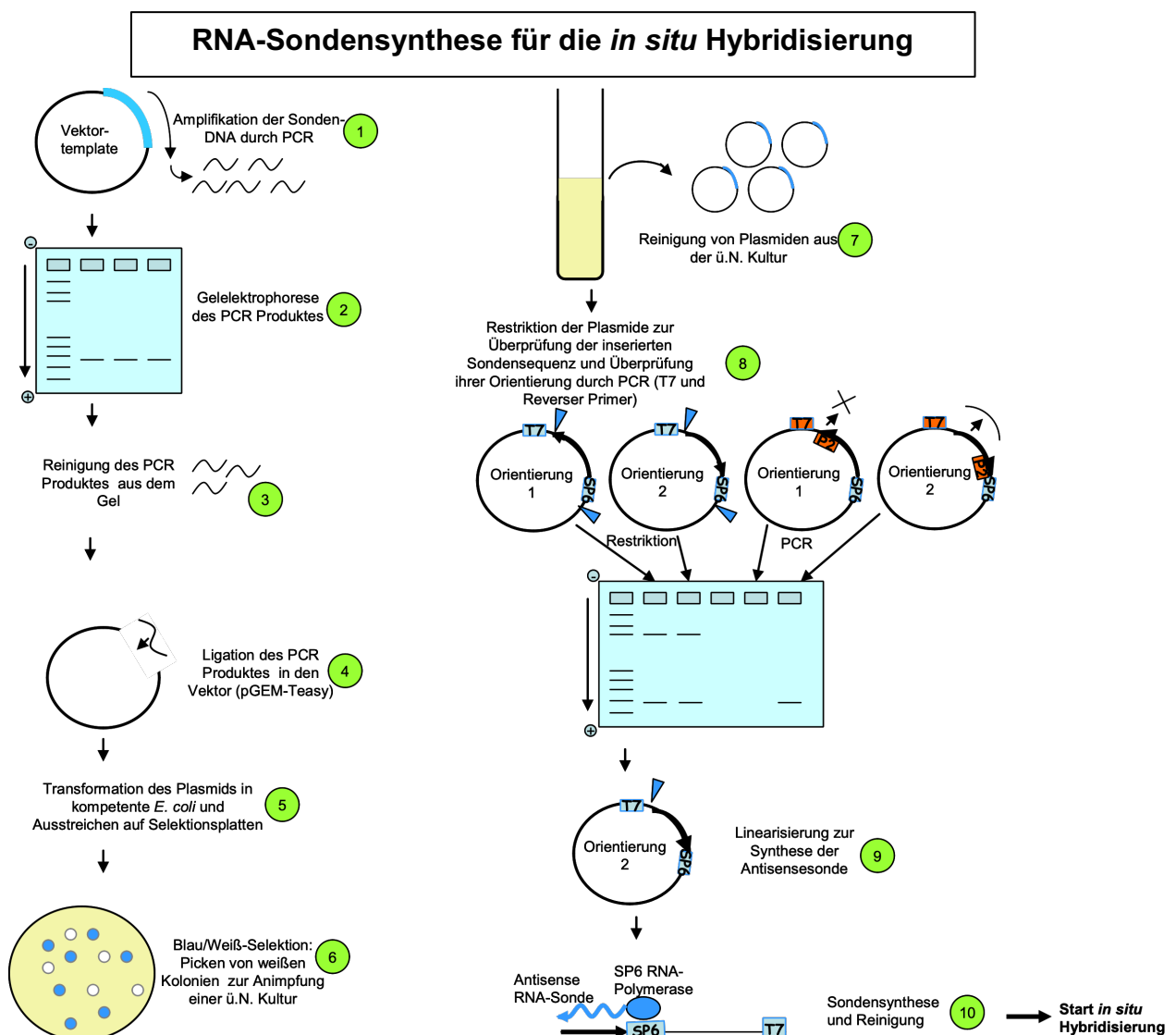
Hybridisierung

Vor der Sonden-Hybridisierung ist es erforderlich, die äußeren Schichten (Chorion, Vitellinmembran) der zu färbenden Embryonen zu entfernen und die Gewebe im Anschluss daran zu fixieren. Genauere Informationen zu diesen Verfahren finden sich im Praktikumsteil *Versuch 1* (Seite 22)

Die in diesem Versuch verwendeten Embryonen sind bereits fixiert und können ohne weitere Vorbehandlung für die Hybridisierung eingesetzt werden. Das Hybridisierungsprotokoll gliedert sich wie folgt:

1. Tag

1. Waschen der Embryonen in PBT (3X 5 min, jeweils in 500 μ l)
2. Drei Minuten Inkubation mit Proteinase K (100 μ g / ml) in PBT bei 37 °C
3. Waschen in PBT (4X 5 min, jeweils in 500 μ l)
4. Nachfixierung in PBT + 5% Formaldehyd (20 min)
5. Waschen in PBT (5X kurz, jeweils in 500 μ l)
6. Waschen in PBT / Hybridisierungspuffer 1:1 (1X 5 min, 250 μ l + 250 μ l)
7. Waschen in Hybridisierungspuffer (1X 5 min, jeweils in 500 μ l)
8. Prähybridisierung in 500 μ l Hybridisierungspuffer (1h, 60 °C)
9. Zugabe der zunächst Hitze-denaturierten (3 min, 94 °C) Sonden (4 μ g / ml)
10. Hybridisierung bei 58 °C über Nacht



2. Tag

11. Waschen in vorgewärmtem (60 °C) Hybridisierungspuffer (5X, jeweils 500 µl, jeweils 10 min in einem Hybridisierungssofen)
12. Waschen in Waschpuffer / Hybridisierungspuffer 1:1 (1X, 250 µl + 250 µl)
13. Waschen in Waschpuffer (4X, jeweils in 500 µl)
14. Zugabe von 495 µl Waschpuffer + 5 µl anti-Dig-Antikörper (Endverdünnung des Antikörpers: 1:2000); Inkubation über 20h bei 4 °C

3. Tag

15. Waschen in PBT (10X, jeweils 10 min, jeweils in 500 µl)
16. Äquilibrierung der Embryonen in 500 µl AP-Puffer für ca. 5 min
17. APP wechseln – Embryonen in Blockschälchen überführen, Eppi mit 500 µl nachspülen und in das Blockschälchen geben.

Handschuhe tragen – NBT/BCIP ist giftig!

17. Start der Entwicklungsreaktion durch Zugabe von 5 µl NBT / BCIP zu 1 ml AP-Puffer
18. Abbruch der Färbereaktion durch Transfer der Embryonen (abgeschnittene Pipettenspitze) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß; anschließendes Abpipettieren des Reaktionspuffers (**Sonderabfall**) und Zugabe von 1 ml PBT

Die Entwicklung kann mehrere Stunden bzw. auch über Nacht andauern und sollte erst dann gestoppt werden, wenn ein deutliches Signal zu erkennen ist. Verfolgt wird die Färbereaktion mit Hilfe eines Binokulares.

Verwendete Puffer:

Hybridisierungspuffer

5x SSC; 50% Formamid; 200 µg/ml tRNA; 100 µg/ml gescherte Heringssperma DNA, 0,1% SDS, 0,1% Tween 20, 1 % Blocking Reagenz, pH 7,0

Nachfixierungs-Puffer

5% Formaldehyd in 1x PBT

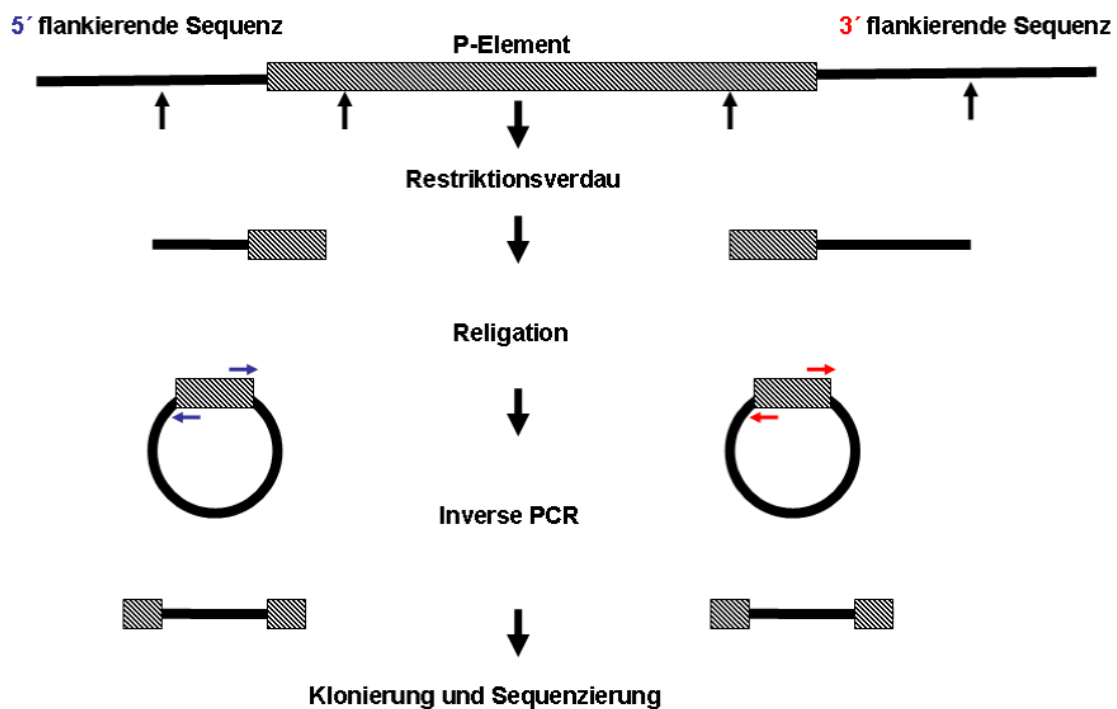
Wasch-Puffer

2% BSA, 0,1% SDS in 1x PBS

Versuch 4: Inverse PCR

Hintergrund

Die Etablierung transgener Organismen ist eine weit verbreitete Methode in der Entwicklungsbiologie und wird in *Drosophila* durch die so genannte Keimbahn-transformation realisiert (siehe Einleitung). Da die Insertion der P-Elemente bei dieser Methode meist mehr oder weniger zufällig erfolgt, ist es notwendig, die genaue Position des Transposons innerhalb des *Drosophila* Genoms bestimmen zu können. Dazu wird die so genannte „inverse PCR“ angewandt. Innerhalb dieses Versuches soll eine inverse PCR an verschiedenen transgenen Linien durchgeführt werden, die aktuell in der AG Zoologie Verwendung finden.



Schematische Darstellung einer inversen PCR. Ziel ist es, die flankierenden Bereiche einer bekannten Sequenz (in unserem Experiment das P-Element) zu amplifizieren. Dafür wird im ersten Schritt die genomische DNA verdaut und anschließend wieder religiert, um zirkuläre DNA Fragmente zu erzeugen. Diese enthalten sowohl Sequenzen des P-Elementes (bekannt) als auch flankierende Sequenzen der genomischen DNA (unbekannt). In einer PCR mit inversen Primern können diese unbekannten flankierenden DNA Abschnitte amplifiziert werden. Dann werden die erhaltenen PCR Produkte für die Sequenzierung vorbereitet, um die Position des P-Elements im Genom zu bestimmen.

Prinzip der inversen PCR

Die inverse PCR dient der Identifizierung von unbekannten DNA Bereichen, die sich in unmittelbarer Nähe eines bekannten DNA Abschnittes (das P-Element) befinden. Dazu wird genomische DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, welches sowohl im Genom der Fliege als auch innerhalb der bekannten Sequenz des P-Elements schneidet (Abbildung). Durch diesen Schritt entstehen kurze DNA Fragmente, welche Teile

des P-Elements (5' und 3' Bereiche) und Teile der flankierenden genomischen DNA enthalten. Um diese Fragmente mittels PCR amplifizieren zu können, müssen die Restriktionsfragmente religiert werden, wodurch ringförmige DNA Moleküle entstehen. Für die PCR verwendet man inverse Primer, welche spezifisch an Sequenzen des P-Elementes binden können. Durch die Verwendung dieser Primer können nun die flankierenden Bereiche des P-Elements amplifiziert, und anschließend sequenziert werden. Da das Genom von *Drosophila melanogaster* vollständig sequenziert ist, kann die erhaltene Sequenzinformation dazu genutzt werden, die genaue Lage des P-Elements im Genom zu bestimmen.

Durchführung

Tag 1

2. Präparation genomischer DNA aus adulten *Drosophila*

- 1.1. 20 adulte Fliegen betäuben (Ether), und in ein Eppendorfgefäß geben.
- 1.2. **200 µl Puffer A** zugeben, und die Fliegen mit dem Pistill vollständig zerreiben.
- 1.3. Weitere **200 µl Puffer A** zugeben und nochmal mörsern.
- 1.4. Die Proben für 30 min auf 65°C inkubieren (Heizblock).
- 1.5. Die Proben mit **800 µl LiCl/KAc** Lösung versetzen und 10 min auf Eis inkubieren (Präzipitation von Proteinen).
- 1.6. 10 min bei 10.000g und 8°C zentrifugieren (Kühlzentrifuge).
- 1.7. Vorsichtig 1 mL des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführen. Dabei vermeiden, dass feste Bestandteile mit überführt werden. Notfalls ein weiteres mal zentrifugieren.
- 1.8. **500 µl Isopropanol** zu den Proben geben und gut mischen (Präzipitation der DNA).
- 1.9. Die Proben 15 min bei mind. 12.000g und 8°C zentrifugieren (Kühlzentrifuge).
- 1.10. Den Überstand vorsichtig und vollständig abnehmen, und werfen (Das Pellet enthält jetzt die ausgefällte DNA). Das Pellet mit **1 ml eiskaltem 70% Ethanol** waschen.
- 1.11. Die Proben erneut für 5 min bei mind. 12.000g und 8°C zentrifugieren (Kühlzentrifuge).
- 1.12. Das Ethanol abnehmen und Pellets vollständig trocknen.
- 1.13. Die Pellets in **100 µl HO** vollständig resuspendieren.

14. Restriktionsverdau der genomischen DNA

2.1. Zum Verdau der DNA muss folgender Ansatz hergestellt werden:

8 µl	genomische DNA
1 µl	10x Puffer
1 µl	MboI ODER HpaII

Die Ansätze müssen durch Auf- und Ab- pipettieren gut gemischt, und zum Schluss kurz abzentrifugiert werden.

- 2.2. Die Ansätze werden für 1h auf 37°C inkubiert (Heizblock).
- 2.3. Die Restriktionsenzyme können durch Hitze inaktiviert werden. Dazu werden die Proben **ENTWEDER** für 20 min auf 65°C (*MboI*) **ODER** für 5 min auf 80°C (*HpaII*) inkubiert.
- 2.4. Anschließend werden die Ansätze auf Eis gestellt.

3. Re-Ligation der DNA Fragmente

3.1. Zur Re-ligation muss folgender Ansatz hergestellt werden:

10 μ l	verdaute, genomische DNA
1.5 μ l	10x Ligationspuffer
2 μ l	<i>T4 DNA Ligase</i>
1,5 μ l	HO

3.2. Die Ansätze müssen durch Auf- und Ab- pipettieren gut gemischt, und zum Schluss kurz abzentrifugiert werden.

3.3. Die Proben werden bei 16°C über Nacht inkubiert.

Tag 2

3.4. Zur Inaktivierung der T4 DNA Ligase, werden die Proben für 20 min bei 65°C inkubiert (Heizblock).

4. PCR

4.1. Für die PCR muss folgender Ansatz, in 0.2 ml Reaktionsgefäßen hergestellt werden:

10 μ l	re-ligierte genomische DNA (template)
2 μ l	10x ThermoPol Puffer
1 μ l	dNTPs (10mM each)
2 μ l	<i>forward</i> Primer
2 μ l	<i>reverse</i> Primer
2,75 μ l	HO
0,25 μ l	Taq DNA Polymerase

Es muss jeweils für das 3' Ende und das 5' Ende eine separate PCR, mit spezifischen Primern angesetzt werden.

Als Oligonucleotidprimer werden EY.3.F und EY.3.R für das 3' Ende (55°C Annealingtemperatur) und Plac1 und Pwht1 für das 5' Ende (60°C Annealingtemperatur) verwendet. Bitte die unterschiedlichen Annealingtemperaturen beachten.

4.2. Die Ansätze müssen durch „anschnippen“ gut gemischt, und zum Schluss kurz abzentrifugiert werden.

4.3. Für die PCR werden die Proben in einen Thermocycler gestellt, und nach folgendem Programm inkubiert:

Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	34x wiederholt
Denaturierung	95°C	20 sec	
Primer Annealing	55°/60°C	20 sec	
Elongation	68°C	1 min 10 sec	
Finale Elongation	68°C	5 min	
Pause	8°C	—	

5. Agarosegelelektrophorese

5.1. **Gel gießen** [1,5g Agarose in 100 ml TAE-Puffer geben und in der Mikrowelle aufkochen (Achtung Siedeverzug!). Dann 1 µl DNA-Stain zugeben, und die noch heiße Agarose in eine Gelkammer schütten. Zm Polymerisieren abkühlen lassen.].

5.2. Die PCR Proben werden mit 4 µl 6x Auftragspuffer versetzt, gemischt und kurz abzentrifugiert.

5.3. Anschließend wird die **gesamte Probe** in eine Tasche des Gels geladen (je nach Dicke des Gels kann die Tasche sehr voll werden).

5.4. Das Gel wird bei 80V laufen gelassen, bis die vorderste Laufront des Puffers das untere Ende des Gels erreicht hat (ca. 45 min).

5.5. Nicht vergessen einen Größenstandard mit aufzutragen!

5.6. Nachdem das Gel fertig gelaufen ist, kann es auf einem UV-Tisch betrachtet und fotografiert werden (**Achtung! UV Licht ist schädlich für Haut und Augen. Unbedingt hinter der Schutzscheibe bleiben oder Visier tragen!**).

6. Isolation der PCR Fragmente aus dem Gel und Sequenzierung

6.1. Die erhaltenen DNA Banden werden mit einem sauberen Skalpell so eng wie möglich, aber so weit wie nötig, aus dem Gel geschnitten, und in ein Eppendorfgefäß überführt.

6.2. Dem Gel werden **400 µl GB Bindepuffer** zugegeben.

6.3. Die Proben werden auf 50°C inkubiert, bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat (Heizblock, Gefäße zwischendurch schütteln).

6.4. Der Probe wird **250 µl Isopropanol** zugegeben. Anschließend das Gefäß schütteln und den Inhalt kurz abzentrifugieren.

6.5. Eine Reinigungssäule in ein 2 ml Auffanggefäß stellen und 800 µl der Probe auf die Säule pipettieren.

6.6. Die Säule mit Auffanggefäß für 1 min bei 11.000g zentrifugieren.

6.7. Durchfluss verwerfen (DNA sollte jetzt an die Säulenmatrix gebunden sein), und **700 µl Wash Buffer** auf die Säule geben.

6.8. Die Säule mit Auffanggefäß für 1 min bei 11.000g zentrifugieren.

6.9. Die Schritte 6.7. und 6.8. einmal wiederholen.

6.10. Durchfluss verwerfen, und die leere Säule für 1 min bei 11.000g zentrifugieren.

6.11. Die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß setzen, und **50 µl Elutionspuffer** auf die Säule geben. Die Säule für 2 min mit dem Puffer inkubieren.

6.12. Die Säule mit Eppendorfgefäß für 1 min bei 11.000g zentrifugieren.

6.13. Die Säule kann verworfen werden (DNA befindet sich jetzt im Eppendorfgefäß).

6.14. Für die Sequenzierung werden je **15 µl der gereinigten DNA** in einem Eppendorfgefäß mit ENTWEDER **1 µl forward Primer** ODER **1 µl reverse Primer** versetzt, und zur Sequenzierung verschickt.

Puffer und Lösungen

Puffer A	100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM EDTA 100 mM NaCl 0.5% SDS
LiCl/KAc	625 µl 5M KAc 250 µl 6M LiCl vor Gebrauch frisch ansetzen

50X Tris-Acetat-EDTA (TAE)	242 g Tris 57 ml Eisessig (100% Essigsäure) 100 ml 0.5M EDTA ad 1000 ml H₂O vor Gebrauch 1:50 mit H₂O auf 1x TAE verdünnen
1.5% Agarosegel	1,5 g Agarose für Gelelektrophorese 100 ml 1x TAE Agarose in der Mikrowelle aufkochen (ACHTUNG! Siederverzug!). Die noch heiße Agarose luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelkammer eingießen (Kamm nicht vergessen). Mindestens 15 min abkühlen lassen bis das Gel vollständig polymerisiert ist.

Versuch 5: Expression verschiedener *Drosophila* Proteine in Insektenzellen und weiterführende Analyse mittels Western Blot

1. Allgemeine Grundlagen

Eine wesentliche Voraussetzung für die funktionelle Analyse eines Proteins liegt darin, das Protein sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* untersuchen zu können. Während die Analyse transgener *Drosophila* eine sehr effektive Methode zur Untersuchung der *in vivo* Funktionalität darstellt, ist es für spezifischere Fragestellungen notwendig, mit einem gereinigten Protein einer definierten Menge zu arbeiten. Mit einer entsprechenden Präparation lassen sich beispielsweise Fragen nach posttranslationalen Modifikationen, Interaktionspartnern oder auch Aktivitäten eines gegebenen Proteins beantworten. Basis dieser Untersuchungen ist ein System, mit dem sich das zu untersuchende Protein in großen Mengen synthetisieren lässt, um es nach anschließender Reinigung einer Fragestellung entsprechend analysieren zu können. Während früher größtenteils Prokaryoten, wie beispielsweise *Escherichia coli*, als Expressionswirt verwendet wurden, kommen seit einigen Jahren vermehrt eukaryotische Expressionssysteme zum Einsatz. Im Gegensatz zu *E. coli* haben diese Systeme den Vorteil, dass exprimierte Proteine zusätzlich zu der gewünschten Aminosäuresequenz meist auch alle posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierungen, Glykosylierungen...) besitzen, die für die Aktivität notwendig sind. Demzufolge kann es für die Analyse von eukaryotischen Proteinen entscheidende Vorteile haben, diese Proteine auch in einem eukaryotischen System zu exprimieren.

In dem vorliegenden Versuch werden Insektenzellen (*Sf21*) eingesetzt, um zwei verschiedene Proteine der Fruchtfliege heterolog zu exprimieren. In diesem Zusammenhang ist es zunächst notwendig, die Zellen zu kultivieren und auf die Transfektion (das Einbringen der zu exprimierenden DNA-Konstrukte) vorzubereiten.

2. Vorbereitung der Zellen

Jede Gruppe bereitet 3 Wells (Kontrolle, Transfektion und Infektion) einer 6-Well Platte vor, wobei in jedes Well 1,25 ml „Insect Xpress“ Medium vorgelegt wird. Im Anschluss wird jedes Well mit *Sf21*-Zellen einer konfluenten Kulturflasche auf 2 ml aufgefüllt (Zugabe von 0,75 ml Zellsuspension). Der Ansatz wird bis auf weiteres in den Inkubationsschrank gestellt.

3. Vorbereitung der Transfektion

Zur Herstellung der Transfektionslösungen werden zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße wie folgt befüllt:

Eppi 1: 5 μ l Rotifect + 25 μ l Medium $\rightarrow$ insgesamt 30 μ l

Eppi 2: 500 ng Bacmid-DNA (proteinspezifisch) + X μ l Medium $\rightarrow$ insgesamt 30 μ l

Anschließend wird die Rotifect-Lösung in die DNA-Lösung gegeben (Reihenfolge beachten!) und durch Pipettieren gemischt. Die nun vollständige Transfektionslösung wird für 20 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig mit 440 μ l Medium auf 500 μ l aufgefüllt.

4. Transfektion

Nach Ablauf der 20 minütigen Inkubationszeit wird der gesamte Ansatz (500 μ l) mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze tropfenweise auf die bereits vorbereiteten Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Platten werden nun in den Kulturschrank zurückgestellt und über mehrere Tage bei 28°C inkubiert.

5. Infektion

Für die Infektion wird ein Well, wie in 10.2 beschrieben, vorbereitet und nach ca. 30 Minuten mit 100 μ l Virusüberstand (proteinspezifisch) versetzt und vorsichtig geschwenkt. Die infizierten Zellen werden mehrere Tage bei 28 °C inkubiert.

Der Fortschritt der Transfektion und Infektion kann täglich mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes verfolgt (positiv transformierte Zellen exprimieren zusätzlich zu den *Drosophila*-Proteinen auch das „green fluorescent protein“ (GFP)) und dokumentiert werden.

Zur Vorbereitung der Immunfärbung werden Wells, wie in (2) beschrieben, vorbereitet. Zusätzlich werden jedoch in den Wells Deckgläschen platziert, auf denen die Zellen adhärent wachsen können. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wird jeder Ansatz mit je 100 μ l Virusüberstand versetzt, vorsichtig geschwenkt und anschließend für 4-5 Tage in den Inkubationsschrank gestellt.

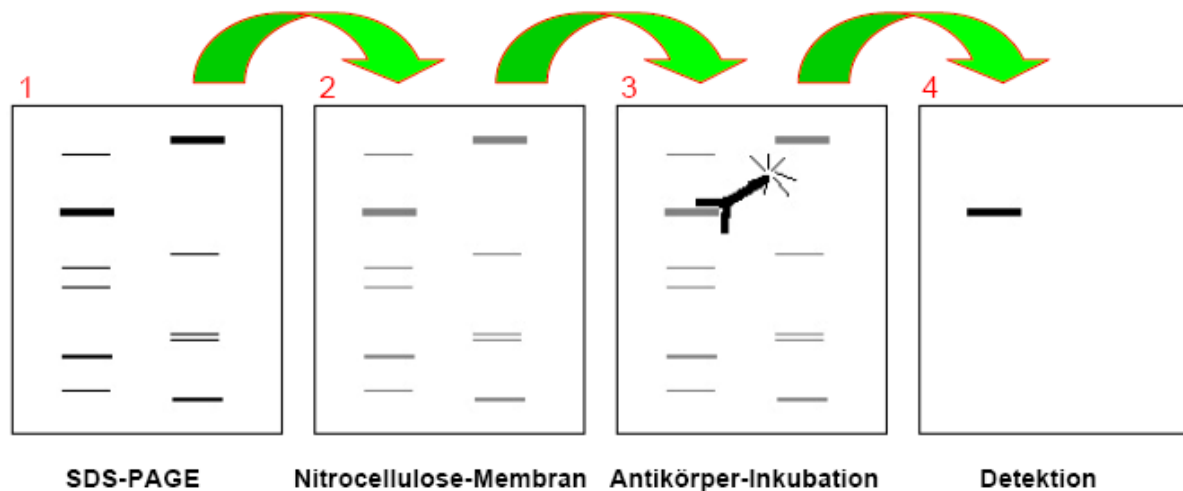
6. Analyse der exprimierten Proteine mittels Western Blot

Allgemeine Grundlagen

In diesem Versuch sollen die in V2 ektopisch exprimierten subzellulären Marker genauer charakterisiert werden. Hierfür werden dieselben Tiere eingesetzt, an denen auch die Lokalisationsstudien (V2) durchgeführt wurden. Ziel ist es, die jeweiligen Reporterproteine, sowie einige ihrer biochemischen Eigenschaften (u.a. molekulare Masse) in der larvalen F1-Generation nachzuweisen. Dieser Nachweis, sowie eine weiterführende Charakterisierung der jeweiligen Konstrukte, erfolgt durch die Methode des Western Blots.

Zunächst werden 3. Larven der F1-Generation mit einem Mörser aufgeschlossen und die im Rohhomogenat enthaltenen Proteine durch Zugabe eines Detergenz (SDS) sowie durch Aufkochen denaturiert. Mit Hilfe einer denaturierenden Polyakrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend voneinander getrennt und dann auf eine Trägermembran übertragen. Im Anschluss können die gesuchten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf der Membran markiert und visualisiert werden, während alle weiteren Proteine ungefärbt bleiben. Es ist somit möglich, komplexe Proteinlösungen auf das Vorhandensein eines bestimmten Proteins hin zu überprüfen. Voraussetzung hierfür ist allerdings die Verfügbarkeit eines

spezifischen Antikörpers gegen das Protein selbst oder gegen einen mit dem Protein verknüpften Anhang (tag). Der Ablauf eines Western Blots gliedert sich wie folgt:



Zunächst wird ein Proteingemisch, das ein oder mehrere Proteine von Interesse enthält, mittels SDS-PAGE massenspezifisch elektrophoretisch getrennt (1). Anschließend werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2) und hier mit proteinspezifischen Antikörpern inkubiert (3). Im Anschluss an die Bindung dieser primären Antikörper wird die Membran mit sekundären Antikörpern inkubiert, die ihrerseits wiederum die Primären erkennen und an sie binden. Diese sekundären Antikörper sind häufig mit Enzymen wie beispielsweise alkalischer Phosphatase konjugiert. Somit kann die Position des gesuchten Proteins durch das Produkt einer enzymatischen Reaktion (s. *in situ*-Hybridisierung, alkalische Phosphatase als katalysierendes Enzym) auf der Membran sichtbar gemacht werden (4).

In diesem Versuch soll das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) mit einem für das Protein spezifischen polyklonalen Antikörper detektiert werden. GFP kommt in der Fruchtfliege endogen nicht vor und wurde mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems ektopisch in den Speicheldrüsen exprimiert. Da in diesem Zusammenhang unterschiedliche Versionen des GFP eingesetzt wurden, sollen die jeweiligen Fusionsproteine mittels Western Blot analysiert werden.

Probenvorbereitung

Zur weiteren Analyse der exprimierten Proteine müssen die Zellen von dem Well abgelöst, aufgeschlossen und einem Western Blot unterzogen werden. Für die Ablösung wird ein sogenannter „Zellschaber“ verwendet, mit dem man die Zellen vorsichtig vom Boden der Platte löst. 100 μ l der jeweiligen Suspensionen werden mit einer abgeschnittenen Spitze in individuelle Eppis pipettiert und abzentrifugiert (3 min, 300 x g). Anschließend wird der Überstand vorsichtig entfernt (Pipette) und für die folgende Infektion bei 4 °C gelagert. Das Pellet wird in 50 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 12,5 μ l 5 x Laemmli-SDS-Auftragspuffer werden die Zellen für 3 min bei 99 °C gekocht, kurz auf Eis abgekühlt. Als Kontrolle wird ein Ansatz bestehend aus untransfizierten SF21 Zellen mitaufgetragen.

SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE werden die jeweiligen Proben zu je 20 μ l in die Taschen eines SDS Gels pipettiert (jede Gruppe max. 4 Taschen). In die linke äußere Tasche des Gels werden 5 μ l eines Protein-Standards gegeben. Dieser Standard dient der späteren Größenbestimmung der markierten Proteine. Sobald alle Proben aufgetragen sind, wird das Gel über einen Zeitraum von ca. 45 min einem elektrischen Feld (Stromstärke: 20 mA / Gel) ausgesetzt. Sobald sich die deutlich sichtbare Blaufront dem Ende des Gels nähert, wird die Stromquelle abgeschaltet, das Gel aus der Kammer entnommen und in Vorbereitung auf den nun folgenden Blot in Transferpuffer gegeben.

Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Ein typischer Western Blot ist wie folgt aufgebaut: Zunächst werden 4 Lagen Whatman-Papier übereinander geschichtet, gefolgt von der Nitrocellulose-Membran. Auf dieser Membran wird das SDS-Gel luftblasenfrei ausgerichtet und abschließend mit 4 weiteren Lagen Whatman-Papier überdeckt. Sowohl die Membran als auch das Whatman-Papier werden der Größe des Gels entsprechend zugeschnitten (8,5 x 6,5 cm) und unmittelbar vor dem Zusammenbau des Blots in Transferpuffer äquilibriert (ca. 5 min). Sobald alle Bestandteile in Position sind, wird die Blotkammer geschlossen und ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 50 mA / Gel angelegt. Nach 90 min ist der Proteinübertrag abgeschlossen. Während des Transfers sollte darauf geachtet werden, dass die anliegende Spannung einen Wert von 20 V nicht überschreitet!

Die Membran wird nun mit einer Pinzette in eine Schale überführt und mit einer Färbelösung behandelt (Ponceau-S), die die transferierten Proteinbanden unspezifisch rot-violett anfärbt. Nachdem die Membran mit destilliertem Wasser abgespült wurde, wird sie auf Whatman-Papier gelegt und mit einem Tesastreifen fixiert.

Detektion des exprimierten Proteins

Vor Beginn der eigentlichen Detektion werden die Spuren der jeweiligen Gruppen markiert, mit einem scharfen Skalpell von der Membran abgeschnitten und in eine Schale überführt. Der Protein-Standard verbleibt auf dem Whatman-Papier.

Die nun folgende Immunfärbung gliedert sich wie folgt:

1. Blockieren der unspezifischen Bindestellen auf der Membran

45 min Inkubation in TBS + 5% Milchpulver (10 ml)

2. Bindung der primären Antikörper an das gesuchte Protein

Inkubation mit anti-HA Antikörpern über Nacht in TBS + 2,5% Milchpulver

3. Entfernen der ungebundenen Antikörper

3x 5 min Waschen in TBS + 0,05% Tween 20 (jeweils 10 ml)

4. Bindung der sekundären an die primären Antikörper

60 min Inkubation mit sekundären Antikörpern, die als Konjugat mit alkalischer Phosphatase vorliegen (Antikörperverdünnung: 1:10.000 in 10 ml TBS + 2,5% Milchpulver)

5. Erneutes Entfernen ungebundener Antikörper

3x 5 min Waschen in TBS + 0,05% Tween 20 (jeweils 10 ml)

6. Entwicklung

Zugabe des Substratgemisches (10 ml Detektionspuffer + 100 μ l NBT / BCIP Stocklösung)

Die Entwicklung kann, abhängig von der vorhandenen Proteinmenge sowie der eingesetzten Antikörper-Verdünnungen, relativ schnell ablaufen (innerhalb weniger Minuten), aber auch durchaus eine Stunde oder länger andauern. Abgestoppt wird die Reaktion durch das Abgießen des NBT / BCIP Substratgemisches und der Zugabe von 10 ml Wasser. Dies sollte allerdings erst dann geschehen, wenn eine deutliche Bande zu erkennen ist (nach Absprache mit Betreuer).

Verwendete Puffer:

TBS-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl

TBS-Tween-Puffer (Waschpuffer)

TBS-Puffer + 0,05% Tween 20

Blockpuffer

TBS-Puffer + 5% Milchpulver

Inkubationspuffer

TBS-Puffer + 2,5% Milchpulver

Detektionspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂

7. Immunfärbung der infizierten Zellen

Nach 4-5 Tagen werden die Gläschen mit den adhärent wachsenden Zellen in eine mit Parafilm ausgelegte Schale überführt und nach dem folgenden Protokoll gefärbt:

- 30 min fixieren mit 3 % PFA (ca. 100 μ l pro Gläschen, Pipettenspitze möglichst immer an der gleichen Stelle des Gläschens ansetzen)

- Fixierlösung abnehmen, 3 mal kurz mit PBS waschen (zugeben und direkt wieder abnehmen)
- 20 min inkubieren mit 2 % BSA, 0,1 % Triton (in PBS)
- 1. Antikörper in PBS verdünnen (anti-Nep4 (rabbit 1:100), anti-HA (mouse 1:200)) über Nacht bei 4 °C inkubieren
- 3 mal kurz mit PBS waschen
- 1 h mit Roti-BLOCK blockieren
- 3 mal kurz mit PBS waschen
- 2. Antikörper in PBS verdünnen (anti-rabbit-Cy3 1:200, anti-mouse-Cy3 1:200) und 90 min bei RT inkubieren (dunkel)
- 3 mal je 10 min mit PBS waschen
- Nach dem letzten Waschen PBS ganz abnehmen und je einen Tropfen Eindeck-Medium auf die Gläschen geben
- Objektträger auf die Gläschen legen und beim Umdrehen Gläschen von Parafilm lösen

Die Präparate können nun unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Ergebnisse dokumentiert werden.

Versuch 6: Physiologie und Verhalten von *Drosophila melanogaster* Experiment 1-3 ist Pflicht. Materialien stehen auf der Laborbank für Sie bereit.

Ziel des Versuches

Mutationen führen nicht immer zu schweren Entwicklungsstörungen und zum vorzeitigen Tod des Tieres. Oftmals sind Mutationen auch homozygot lebensfähig und die Tiere haben auf den ersten Blick ein normales Erscheinungsbild, zeigen aber verminderte physiologische Leistungen oder ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten. Daher gehört zu einer vollständigen Charakterisierung einer Mutation immer auch die Analyse der Sinnesleistungen, Lokomotion, Flugfähigkeit, Wahrnehmung von Reizen, Lebensdauer, Entwicklungsverzögerungen, Körpergröße und vieles mehr. Ziel dieses aus mehreren einzelnen Experimenten bestehenden Versuchsblocks ist es, sie mit einigen physiologischen „Read-outs“ und den zugehörigen Analysemethoden vertraut zu machen. Sie sollen lernen, ein Experiment zu planen, sich Gedanken über die Anzahl der Messungen zu machen, die Ergebnisse darzustellen und auf statistische Signifikanz hin zu überprüfen. Einige Experimente wurden entwickelt, um in groß angelegten „Screens“ schnell und zuverlässig nach Mutanten mit Defiziten in Sinnesleistungen oder der Muskelfunktion zu suchen.

Experiment 1: Geschlechterverhältnis, Student's *t*-Test.

Experiment 2: Hell/Dunkelwahrnehmung von Larven.

Experiment 3: Lokomotion von Larven: Vergleich Wildtyp vs Mutante. Überprüfen Sie, ob beispielsweise die Mutation *Mical* zu einem larvalen Lokomotionsdefekt führt. Wenden Sie verschiedene Auswerteverfahren an, bspw. Per Hand oder mittels Tracking-Software.

Experiment 4: Kletterassay (Imagos): Überprüfen Sie, ob beispielsweise die Mutation *Mical*, *Su(z)2* usw. zu einem Kletterdefekt bei Imagos führt.

Experiment 5: Chemotaxis: Analysieren Sie, inwieweit die Larven auf Duftstoffe reagieren können. Welche Stoffe fungieren als Lock-, welche als Schreckstoff?

Benötigte Fliegenstämme:

- 1: Beliebige, white, Orgeon, Canton S, OsnaT o.a.
- 2: Beliebige, white, Orgeon, Canton S, OsnaT o.a.
3. Orgeon/CantonS, OsnaT, wishful thinking, neuroligin1, mical, highwire, kinesin heavy chain
4. wie 3 und **hand C GFP 1.1**
5. Beliebige, white, Orgeon, Canton S, OsnaT o.a.

Versuchsdurchführung Experiment 1 (Geschlechterverhältnis)

Ziel: Schlüpfen weibliche und männliche Tiere zeitgleich oder zeitlich versetzt und im Verhältnis 1:1? Zeitaufwand mit Auswertung und grafischer Darstellung: 60 Minuten

- Zirka 300 Tiere aus einem Fliegen-Ethanol-Gefäß (**Orkus**) werden nach ihrem Geschlecht sortiert und ausgezählt.
- Sie erfassen täglich tabellarisch **alle** Tiere, die in einem Zuchtansatz schlüpfen. Die Auswertung endet, wenn keine Tiere mehr schlüpfen. Dazu erhalten Sie ein oder mehrere Zuchtgefäße. Am frühen Nachmittag betäuben Sie alle Tiere aus den Gefäßen und bestimmen das Geschlecht. Die Tiere werden in einem neuen Zuchtgefäß gesammelt und später für den Kletter-Assay eingesetzt.

Tabelle zum Eintragen der Daten:

	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do
female											
male											

c)

Benötigte Materialien für dieses und alle weiteren Experimente: Basisausstattung

Mikrowelle oder Heizrührer

Meßzylinder, Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Schott-Schraubgläser 250, 500 ml

Agar

schwarze Farbe

Fliegenorkus

Waage, Wägeschälchen, Spatel, Spatellöffel, Rührfischchen

Fliegen-Orkus, Pinsel, Stereomikroskop

Petrischalen

Sektormatrix für Petrischalen

Chi-Quadrat-Methode

Mit Hilfe der Chi-Quadrat-Methode lässt sich ermitteln, ob die beobachteten Werte statistisch von dem zu erwartenden Geschlechterverhältnis von 1:1 abweichen. Dazu berechnet man die Wahrscheinlichkeit P (probability) dafür, eine ebenso schlechte oder noch schlechtere Übereinstimmung des Befundes mit der Erwartung zu erhalten, unter der Voraussetzung, dass der Befund durch Zufall zustande kam. Ist die Wahrscheinlichkeit groß (z.B. $P = 0,45$), die beobachtete oder eine noch größere Abweichung zu erhalten, so wird die Nullhypothese (Übereinstimmung von Befund und Erwartung) beibehalten; ist diese Wahrscheinlichkeit klein (z.B. $P = 0,001$), so wird die Nullhypothese verworfen. Die Grenze für Annahme oder Ablehnung einer Nullhypothese ist für $P = 0,01$ vereinbart. Das bedeutet auch, dass eine von hundert solchen Entscheidungen falsch sein wird (Irrtumswahrscheinlichkeit).

P erhält man, indem man Chi-Quadrat berechnet und dann unter Berücksichtigung der Zahl der „Freiheitsgrade“ (FG) aus eine Tabelle den zugehörigen P -Wert entnimmt. Die Formel zur Berechnung von Chi-Quadrat lautet: $(B-E)^2 / E$

Hierbei steht B für die beobachteten, E für die erwarteten Werte (absolute Zahlen, keine Prozentwerte). Chi-Quadrat-Werte sind immer positiv da sie aus Summen quadrierter Werte hervorgehen.

Beispiel: Prüfung des 1:1 Verhältnisses der Geschlechter aus einer Nachkommenschaft.

	Weibchen	Männchen	Summe N
B	26	14	40
E	20	20	40
B-E	6	-6	
(B-E)²	36	36	
(B-E)² / E	1,8	1,8	
= 1,8 + 1,8 = 3,6			

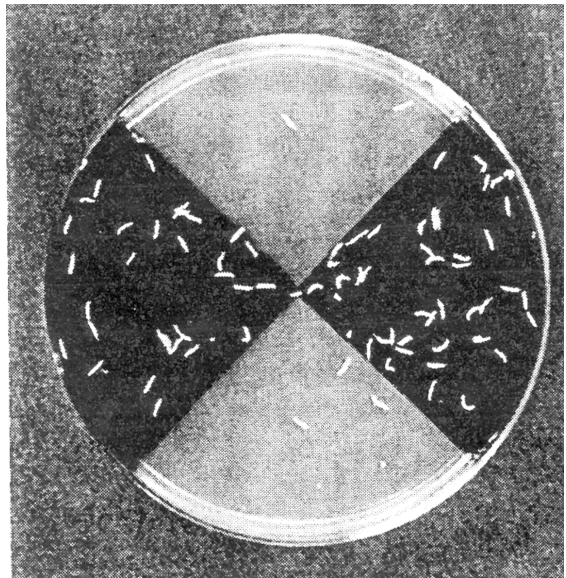
Bei vorgegebenem N und beobachteter Anzahl Weibchen ist im Beispiel die Zahl der Männchen festgelegt: daher nur 1 Freiheitsgrad. Bei Prüfung eines 9:3:3:1-Verhältnisses ist die Zahl der Freiheitsgrade entsprechend $3 / \text{Anzahl Klassen} - 1$). Ein Chi-Quadrat von 3,6 bei 1 Freiheitsgrad ergibt ein $P > 0,05$. Damit ist die Abweichung des Befundes von der Erwartung zufällig.

FG	0,90	0,70	0,50	0,20	0,10	0,05	0,01
1	0,02	0,15	0,46	1,64	2,71	3,84	6,64
2	0,21	0,71	1,39	3,22	4,60	5,99	9,21
3	0,58	1,42	2,37	4,64	6,25	7,82	11,34
4	1,06	2,20	3,36	5,99	7,78	9,49	13,28

Versuchsdurchführung Experiment 2 (Phototaxis-Experiment) - Setup 1

Zeitaufwand: Tag 1, Petrischalen herstellen: ca. 1 Stunde; Tag 2, Durchführung des Experiments mit grafischer Darstellung der Ergebnisse: 1 Stunde

1. Bereiten Sie zwei Petrischalen mit 3 % Agar oder 3 % Agarose vor (3mm Gießdicke), von denen eine jeweils 1 ml/100 ml schwarze Lebensmittelfarbe enthält. Für die Herstellung einer großen runden Agarplatte wiegen sie 3g Agar ein und geben 100 ml Leitungswasser hinzu. Verwenden Sie 250 ml-Schott-Schraubflaschen. In der Mikrowelle wird unter häufigem Schwenken der Agar vollständig aufgelöst (keine Schlieren, Siedeverzüge beachten). **Während des Erhitzens darf der Schraubdeckel keinesfalls fest auf der Flasche verschraubt sein (Überdruck!).** Die Agarlösung wird heiß in die Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten werden die Agarschalen kühl gelagert.
2. Schneiden Sie den Agar aus jeder Schale in Quadranten und verschieben Sie die Quadranten so, dass jeweils zwei Schalen mit gegenüberliegenden transparenten Quadranten und zwei gegenüberliegenden dunklen Quadranten entstehen.
3. Gießen Sie 12 ml 3 %igen Agar darauf, um eine glatte Oberfläche zu erzeugen, auf der die Larven krabbeln können.
4. Stellen Sie die Schalen auf einen Leuchtkasten. Bereiten Sie eine Schablone vor, die nur Licht in der Größe der verwendeten Petrischale durchlässt. Die Testarena muss auf Raumtemperatur adaptiert sein. Ggf. rechtzeitig aus dem Kühlraum holen.
5. Setzen Sie die Larven (frühe 3. Larven sowie „Wanderlarven“) in die Mitte der Schale und geben Sie ihnen 5 (10) min Zeit, um zwischen dem transparenten und dem dunklen Quadranten zu wählen. Mit Hilfe eines kleinen Kartons schirmen Sie die Arena von Umgebungslicht ab.
6. Auf diese Weise lassen sich schnell Mutanten und Kontrollen testen (Triplikate anfertigen). Setzen Sie je Einzelversuch 30 Tiere ein. Berechnen Sie einen Reaktionsindex (RI). Alle Tiere im hellen Quadranten = 1, kein Tier im hellen Quadranten = 0.



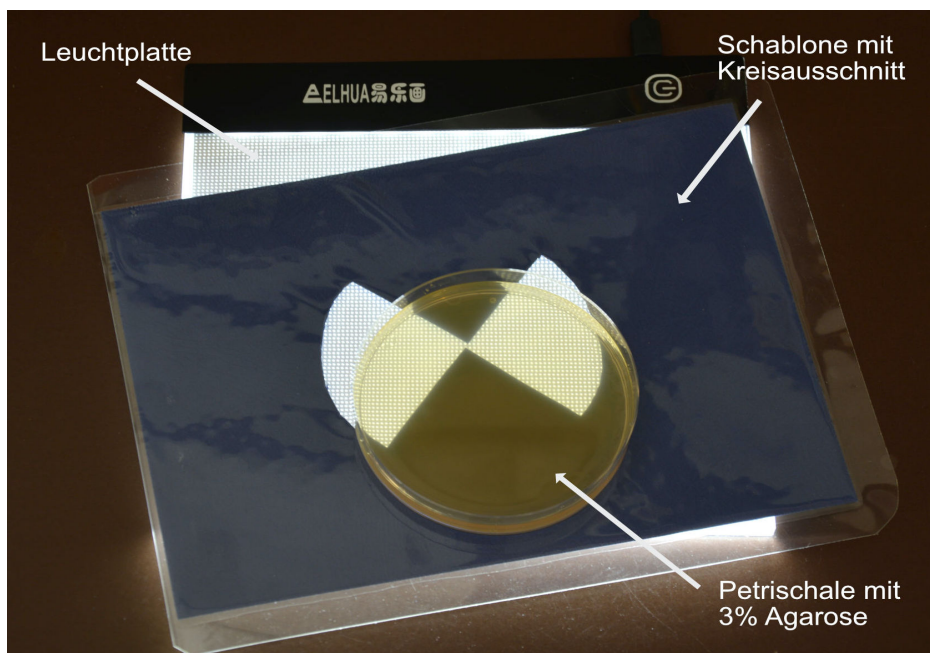
Benötigte Materialien:

- Frühe 3. Larven sowie „Wanderlarven“
- Petrischalen
- Schablone
- Lichtbox
- Agarose
- Lebensmittelfarben
- Mikrowelle, Waage, Wiegepapier, Meßzylinder Erlenmeyer

Versuchsdurchführung Experiment 2 (Phototaxis-Experiment) - Setup 2

Zeitaufwand: Tag 1, Petrischalen herstellen: ca. 1 Stunde; Tag 2, Durchführung des Experiment mit grafischer Darstellung der Ergebnisse: 1 Stunde

1. Bereiten Sie Petrischalen mit 3 % Agar oder 3 % Agarose vor.
2. Schieben Sie zwischen Leuchtplatte und Versuchsarena eine lichtdichte Schablone mit Propeller-Ausschnitten. Die Ausschnitte müssen passend zur Größe Ihrer Versuchsarena gewählt werden (siehe Foto).
3. Setzen Sie die Larven (frühe 3. Larven sowie „Wanderlarven“) in die Mitte der Arena und geben Sie ihnen 5 (10) min Zeit, um zwischen den transparenten und den dunklen Ausschnitten zu wählen. Mit Hilfe eines Kartons schirmen Sie die Arena vor Umgebungslicht ab.



Benötigte Materialien:

- Frühe 3. Larven sowie „Wanderlarven“
- Petrischalen
- Schablone
- Lichtbox
- Agarose
- Lebensmittelfarben
- Mikrowelle, Waage, Wiegepapier, Meßzylinder, Erlenmeyerkolben

Versuchsdurchführung Experiment 3 (Lokomotions-Experiment)

Zeitaufwand: Tag 1, Petrischalen herstellen: ca. 1 Stunde; Tag 2, Durchführung des Experiment mit grafischer Darstellung der Ergebnisse: 2 Stunden

1. Sie benötigen eine große runde oder rechteckige Petrischale mit einem Boden aus 3 % Agarose oder 3% Agar.
2. Achtung: Für das Lokomotionsexperiment müssen die Arenen einen Tag vor Nutzung aus dem Kühlschrank genommen und auf Zimmertemperatur gebracht werden.
3. Die Arena wird auf ein Blatt Millimeterpapier in die „Copybox“ gelegt (siehe Abbildung).
4. Einzelne Larven werden in die Mitte der Versuchsarena gesetzt (siehe Foto). Nach einer kurzen Erholungsperiode wird die Bewegung der Larven gefilmt.
5. Für die filmische Dokumentation verwenden Sie bitte ihr Handy, iPad oder Tablet (siehe Foto). Machen Sie sich vor Beginn des Experiments mit der Filmaufnahmefunktion vertraut.



Testen sie die Belichtungseinstellungen sowie ggf. das manuelle Scharfstellen.

6. **Auswertung A:** Die Anzahl der Quadrate, die von der Larve betreten werden, wird innerhalb eines definierten Zeitfensters, z.B. in einem 30-Sekunden-Zeitfenster über eine Gesamttestdauer von 180 Sekunden, erfasst.

7. **Auswertung B:** Nutzen Sie eine Tracking-Software (bspw. WormTrack, FIMTrack) zur Datenanalyse. Ggf. ist eine Eichung der Versuchsarena notwendig.

8. **Auswertung C:** Als vollautomatische Alternative bietet sich unser Zantkis-Tracking-System an. Dies erfordert etwas Einarbeitungszeit.

Bestimmen sie die Lokomotionseigenschaften wie bspw. Geschwindigkeit, Pausen, geradliniges Kriechen.

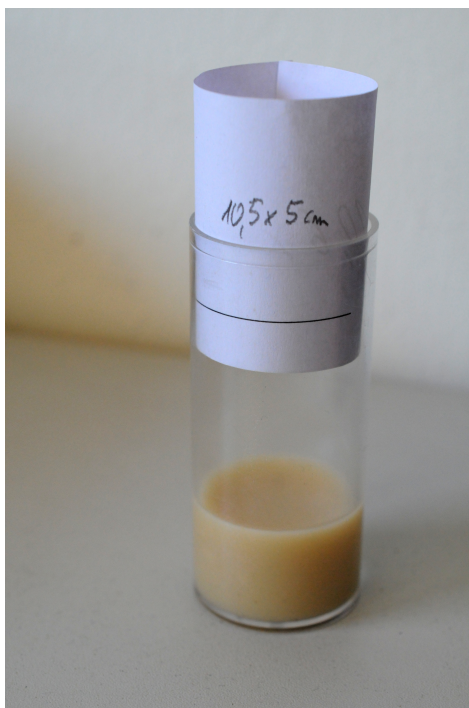
Benötigte Materialien:

1. Larven (geht das mit allen Larvenstadien ?)
2. Petrischalen oder andere flache Plastikschalen
3. Agar/Agarose
4. Handy
5. Scanlio-Scanbox
6. Software zur Auswertung der Filme

Versuchsdurchführung Experiment 4 (Klettertest)

Beeinträchtigungen des Klettervermögens adulter *Drosophila* können verschiedene Ursachen haben, beispielsweise Entwicklungsstörungen in der Bewegungsmuskulatur, Sarkomerdefekte, fehlerhafte Innervierung der Muskulatur oder auch direkte Defekte in Motorneuronen. Können die Tiere nur an glatten Oberflächen nicht laufen, sonst jedoch gut, können auch fehlentwickelte Haftorgane die Ursache sein.

1. Bereiten Sie mehrere *Drosophila*-Zuchtröhrchen mit unterschiedlich rauen Innenflächen vor. Dazu schneiden Sie aus dem gewählten Oberflächenmaterial ein Rechteck von 10,6 x 5 cm Größe aus, rollen es auf und schieben es in das Zuchtgefäße (siehe Foto). Transparente Materialien sind vorzuziehen, da die Tiere dann direkt beim Klettern beobachtet werden können.
2. Denken Sie sich selbst ein einfaches Setup aus, um beispielsweise verschiedene Körnungen von Schleifpapier testen zu können.
3. Nun werden jeweils 10 Versuchstiere in ein Zuchtgefäß gegeben. Klopfen Sie die Tiere auf den Boden des Zuchtgefäßes und beobachten Sie deren Klettervermögen (siehe Foto). Sie können verschiedene wildtypische und mutante Tiere auf unterschiedlichen Oberflächen testen. Zur Dokumentation wählen sie die Tiere, die in einem sinnvollen Zeitfenster den Deckel des Gefäßes erreicht haben. Als Dokumentation eignen sich Filmaufnahmen.
4. Erstellen Sie eine Grafik mit den Versuchsergebnissen in Masterarbeitsqualität.



Versuchsdurchführung Experiment 5 (Chemotaxis)

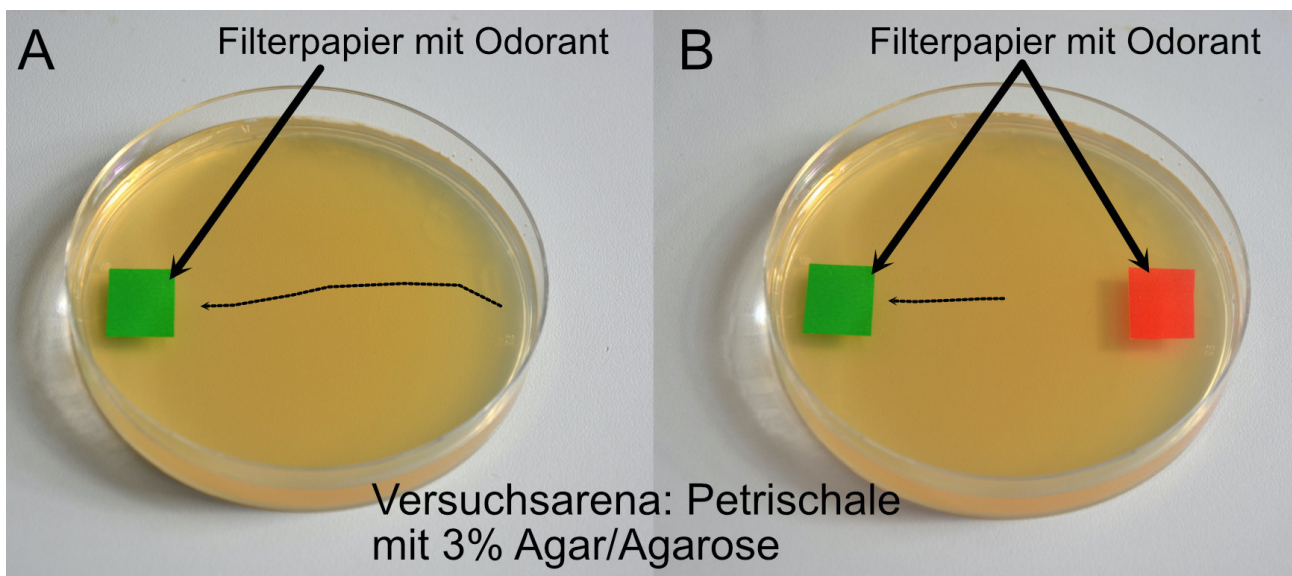
Drosophila besitzt einen exzellenten Geruchssinn. Larven und Imagos reagieren oft auf unterschiedliche Gerüche. Haben Sie eine Idee, warum dies so ist?

Wir testen Larven in einer einfachen Arena (siehe Fotos).

1. Sie benötigen eine große runde oder rechteckige Petrischale mit einem Boden aus 3 % Agar.
2. Ein mit dem Odorant getränktes Stückchen Filterpapier, hier durch grünes und rotes Papier dargestellt, wird am Rand präsentiert (A). Die Larven werden gegenüber in die Arena eingebracht. Der gestrichelte Pfeil symbolisiert die Wirkung eines Lockstoffes.
3. Dokumentation des Verhaltens wie im Lokomotionsexperiment.
4. Bei zwei Geruchsstoffen gleichzeitig (B), werden die Larven mittig eingesetzt.
5. Es können verschiedene Konzentration von Geruchsstoffen getestet werden.
6. Für A: Wie könnten sie durch einfachste Modifikation des Versuchsaufbaus eine Quantifizierung der Wirkung des Lockstoffes vornehmen, so dass Sie, beispielsweise in einer Masterarbeit, eine Grafik mit statistischer Auswertung präsentieren könnten?

Benötigte Materialien:

1. Fröhe 3. Larven
2. Petrischalen
3. Duftstoffe (Isoamylacetat, Methylacetat, Benzaldehyd, Alpha-Pinen, Hefezellen)



Versuch 7: Lipidfärbung an dritten Larven (Ölrot O-Färbung)

3. Larven hungern - OPTIONAL

- 1.1. Larven des gewünschten Genotyps sammeln.
- 1.2. Die Larven anschließend entweder auf Apfelsaftschalen mit etwas Hefe (gefüttert) oder auf ein in Wasser getränktes Filterpapier (hungrig) überführen, und mindestens 4 Stunden warten.

15. Präparation

- 2.1. Die Larven in 1 ml **PBS** in einem Blockschälchen überführen und gründlich mit einem Pinsel abwaschen.
- 2.2. Larven in 1 ml frischem **PBS** in einem Blockschälchen mit zwei Pinzetten „zerrupfen“, so dass der Fettkörper, die inneren Organe und die innere Epidermis frei liegen.

1. Fixierung

- 3.1. **PBS** absaugen, und Larven für 10 min in 1 ml **Fixierlösung** fixieren (bei Raumtemperatur auf dem Platz).
- 3.2. Die Fixierlösung absaugen und verwerfen. Die Larven zweimal kurz in Wasser waschen.

4. Färbung

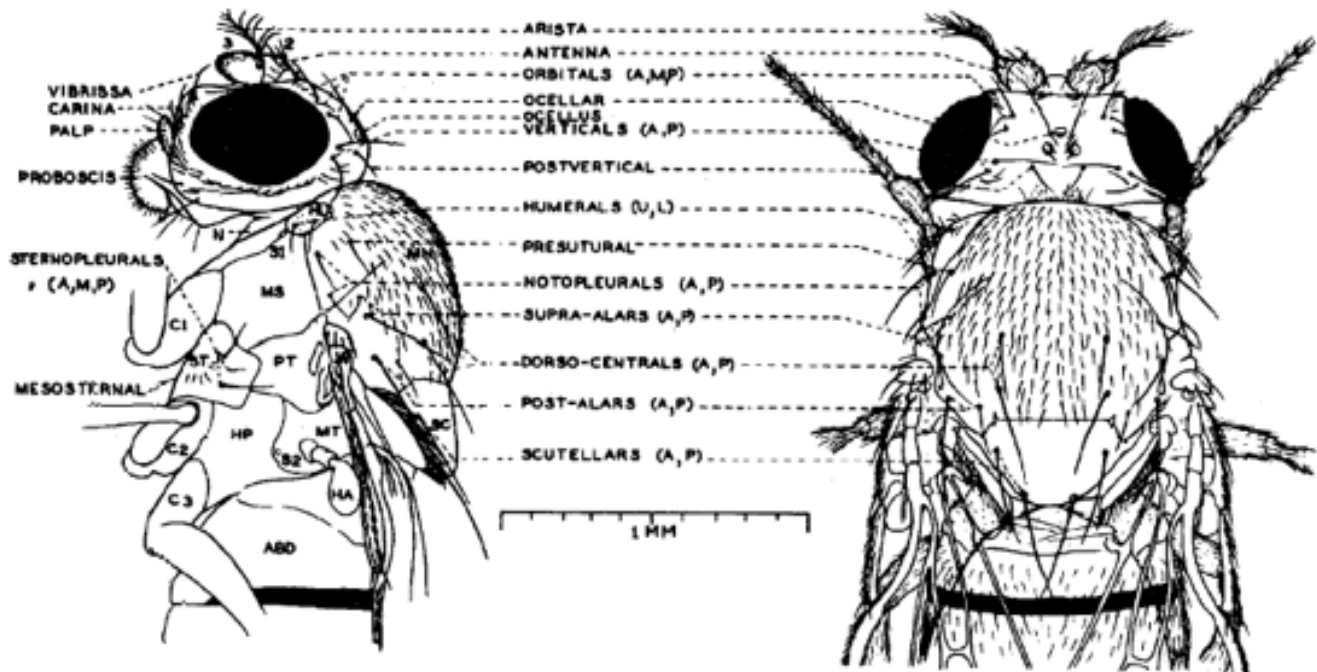
- 4.1. Die Larven für 20-30 min in 1 ml **Färbelösung** im Blockschälchen färben (sauber arbeiten, Ölrot-O färbt Kleidung, Haut und die Laborbank).
- 4.2. Larven 2-3 mal gründlich in H₂O waschen.
- 4.3. Die Fettkörper in einem Tropfen 80% Glycerol auf einem Objektträger mit Deckglas eindecken. Ggf. können kleinere Deckgläschen als Spacer eingesetzt werden, da das Gewebe teilweise sehr dick ist.

Puffer und Lösungen

Färbelösung	600 µl 0.1% Ölrot-O in Isopropanol 400 µl H ₂ O Für jede Färbung frisch ansetzen.
1x PBS	140 mM NaCl 2.7 mM KCl 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄
Fixierlösung	100 µl 37% Formaldehyd 900 µl 1x PBS (entspricht 3.7% Formaldehyd)

6. Anhang: Abbildungen zur Anatomie

Abb.: Schematische Darstellung der vorderen Hälfte einer *Drosophila melanogaster*



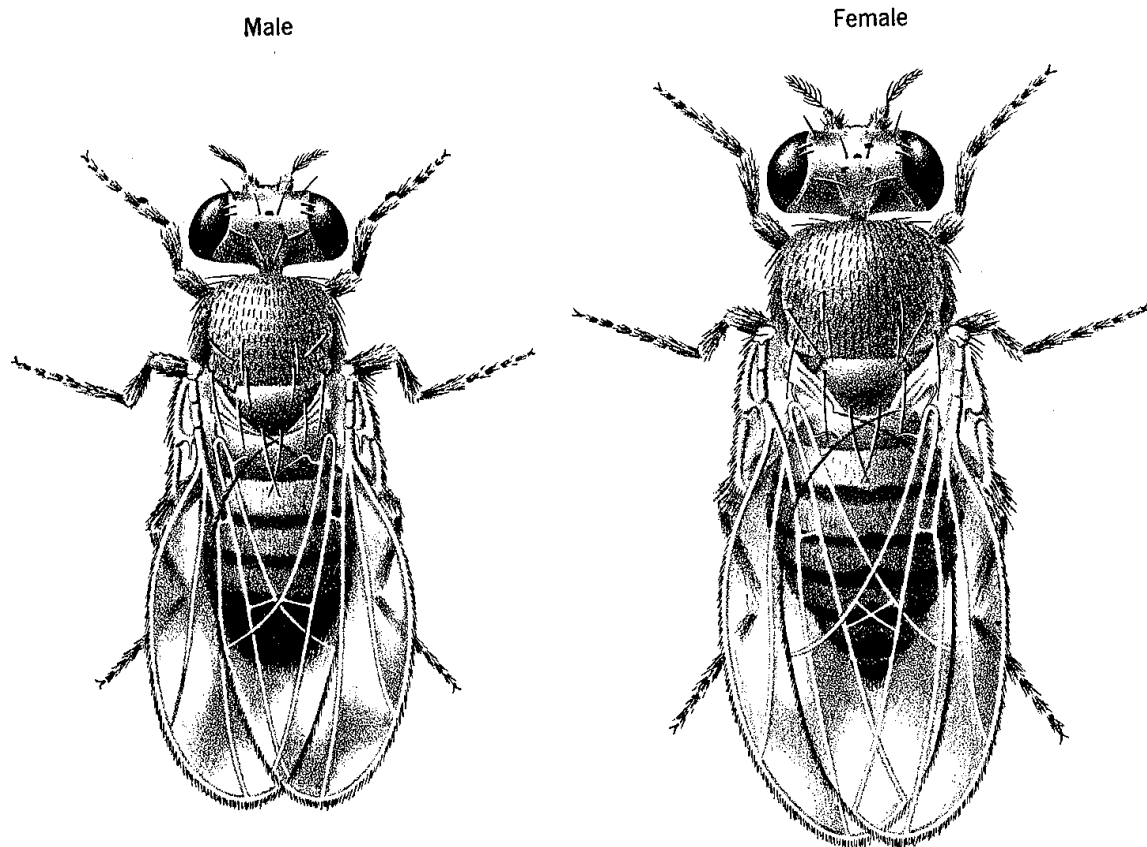


Figure 5. Adult male and female *Drosophila melanogaster*. (After Morgan.)

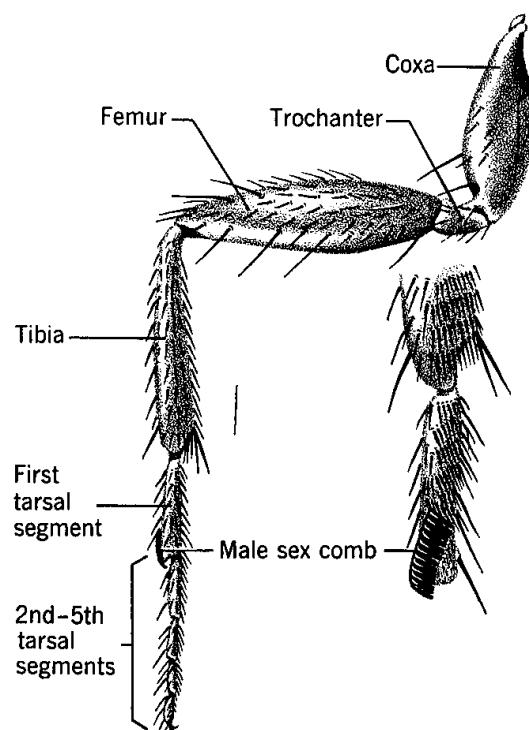


Figure 6. Male foreleg of *Drosophila melanogaster* showing the sex comb on the first metatarsal segment with an enlarged view on the right. (After Ferris.)

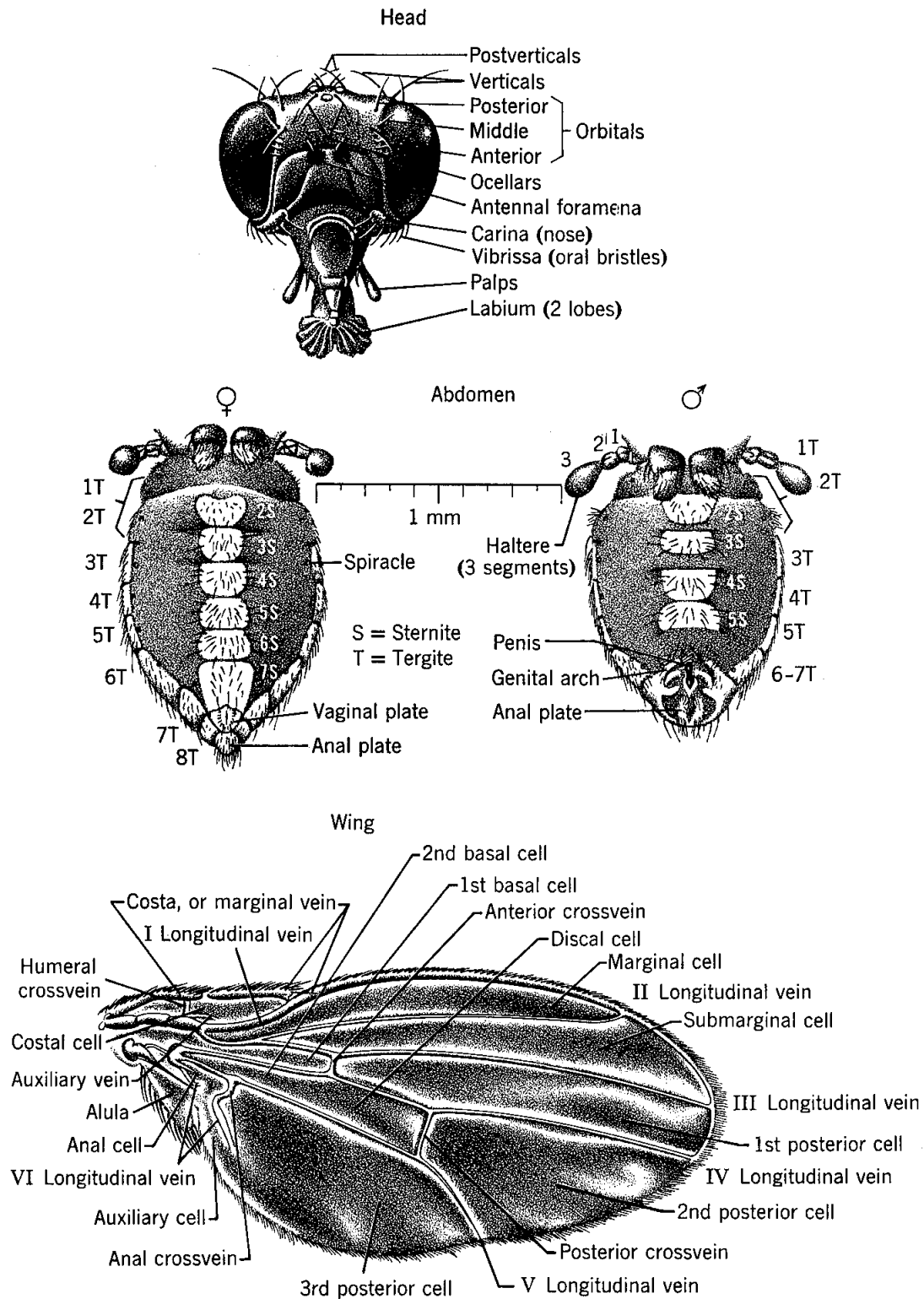


Figure 8. External structures of *Drosophila melanogaster*. Above: front view of head with antennae removed. (After Ferris.) Center: ventral views of female and male abdomen. (After Bridges.) Below: wing structure. (After Bridges.)

Experiments in Genetics with *Drosophila*

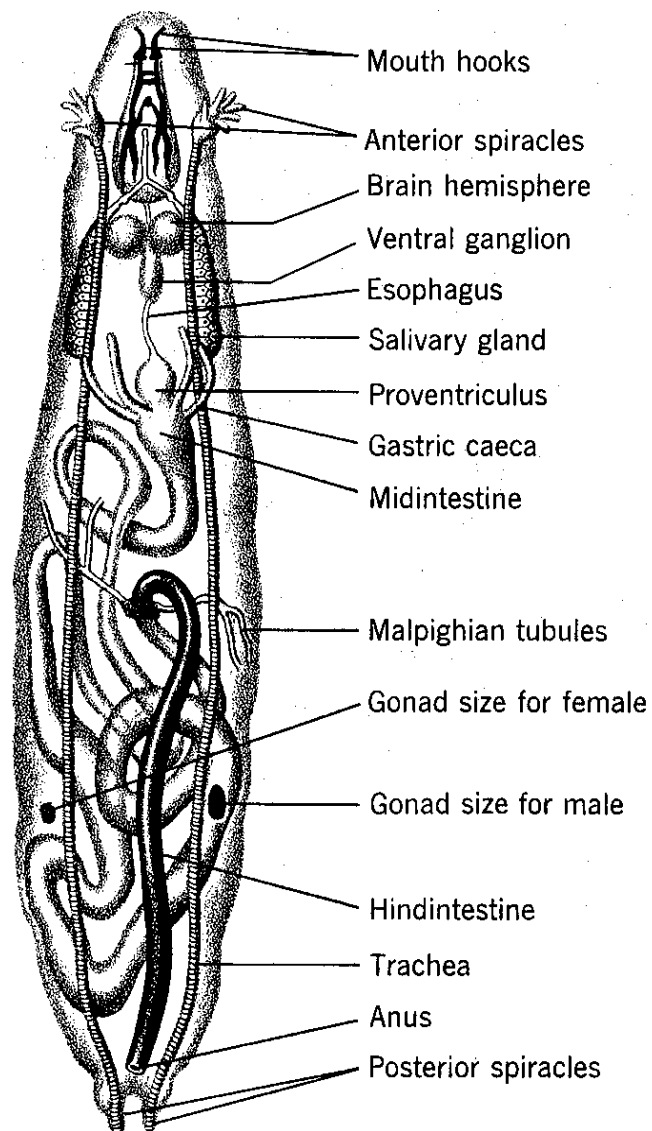


Figure 3. Internal structure of larva. (After Strasburger, and after Bodenstein.)

Vektorkarte pGEM-T Easy

II.C. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

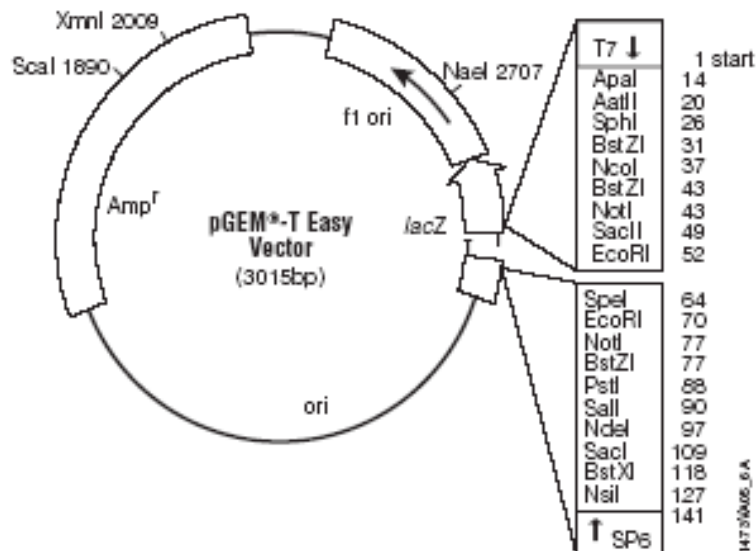


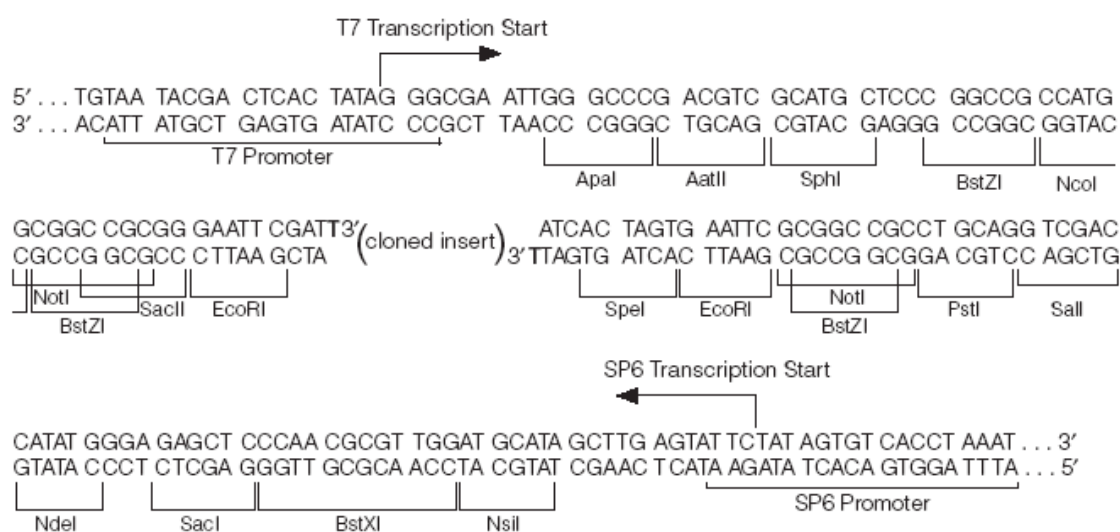
Figure 3. pGEM®-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

Note: Inserts can be sequenced using the SP6 Promoter Primer (Cat.# Q5011), T7 Promoter Primer (Cat.# Q5021), pUC/M13 Forward Primer (Cat.# Q5601), or pUC/M13 Reverse Primer (Cat.# Q5421).

pGEM®-T Easy Vector



1517MA

Figure 1. The promoter and multiple cloning sequence of the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors. The top strand of the sequence shown corresponds to the RNA synthesized by T7 RNA polymerase. The bottom strand corresponds to the RNA synthesized by SP6 RNA polymerase.