

# **Neurobiologie von Drosophila**



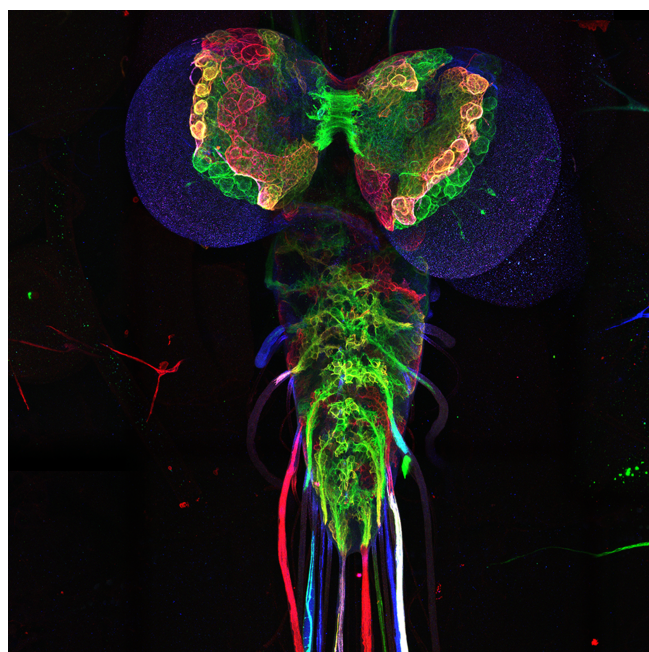
**Arbeitsgruppen**  
**Klämbt, Stanewsky**





# Kursfahrplan

<i>Woche 1</i>	<i>Genetik</i>
Montag	Einführung Kreuzungsgenetik, Gal4 System etc
Dienstag	Gateway Klonierung axo Promotoren
Mittwoch	Gateway Klonierung axo Promotoren
Donnerstag	GRASP RNAi, Antikörperfärbung
Freitag	Antikörperfärbung
<i>Woche 2</i>	<i>Gliale Zellen</i>
Montag	Auswertung Antikörperfärbung
Dienstag	RNAi
Mittwoch	FIM
Donnerstag	FIM
Freitag	Auswertung
<i>Woche 3</i>	<i>Circadiane Rhythmik</i>
Montag	
Dienstag	
Mittwoch	
Donnerstag	
Freitag	
<i>Woche 4</i>	<i>Circadiane Rhythmik</i>
Montag	
Dienstag	
Mittwoch	
Donnerstag	
Freitag	



## Einleitung

Viele Arbeiten der letzten Jahre haben übereinstimmend gezeigt, dass die Analyse von Modellorganismen zu systemübergreifenden Erkenntnissen führt. Insbesondere Forschungen an der Taufliege *Drosophila melanogaster* haben in den vergangenen Jahren zu wesentlichen Einblicken in die genetische Steuerung der Entwicklung auch bei Säugetieren und beim Menschen geführt. *Drosophila* wird seit fast 100 Jahren genetisch untersucht. Der Organismus ist experimentell relativ leicht handhabbar und wird nicht zuletzt wegen der geringen Zuchtkosten häufig auch im Schulunterricht eingesetzt. Eine Vielzahl von molekulargenetischen Techniken erlaubt in Kombination mit der im letzten Jahrhundert aufgebauten genetischen Methodik eine effiziente und weitreichende Analyse einzelner Genfunktionen. Viele der in den letzten Jahren erhaltenen Forschungsergebnisse zeigen, dass die wesentlichen Entwicklungs- und Funktionsprinzipien während der Evolution stark konserviert sind.

## Genomsteckbrief

Nukleäres Genom: 180.000 Mb

Chromosomenzahl: 4

Zahl der proteinkodierenden Gene: 13.500 –19.000

## Zeittafel

1907	Thomas Hunt Morgan führt <i>Drosophila melanogaster</i> als Untersuchungsobjekt in die Genetik ein. Mit seinen Schülern Alfred Sturtevant, Calvin Bridges und Hermann Muller beweist er in den Folgejahren die Chromosomentheorie der Vererbung (Nobelpreis 1933).
1908	Morgan entdeckt und beschreibt die erste <i>Drosophila</i> Mutation <i>white</i> .
1913	Sturtevant erstellt die erste Genkarte und zeigt damit die lineare Abfolge der Gene auf den Chromosomen.
1914	Bridges entdeckt das Phänomen non-disjunction und zeigt, dass die Chromosomen Träger der Gene sind.
1927	Muller entdeckt die mutagene Wirkung der Röntgenstrahlung (Nobelpreis 1946).
1969	Joseph G. Gall und Mary-Lou Pardue führen die <i>in situ</i> Hybridisierung an Polytän-Chromosomen ein.
1978	Edward Lewis entwickelt das Konzept der homöotischen Gene (Nobelpreis 1995).
1980	Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus decken die Grundmechanismen der Segmentierung auf (Nobelpreis 1995).
1982	Gerald Rubin und Allan Spradling erzeugen transgene Fliegen.
1987	Cahir O’Kane und Walter Gehring entwickeln die Enhancer trap-Technik.
1989	Kent Golik und Susan Lindquist führen das FLP/FRT-System der Hefe zur ortsspezifischen Rekombination ein.
1993	Andrea Brand und Norbert Perrimon übertragen das GAL4/UAS-Transaktivierungssystem aus der Hefe in <i>Drosophila</i> und ermöglichen damit die gezielte ektopische Expression von Genen.
1999	Erste RNAi Experimente in <i>Drosophila</i> .
2000	Erste Veröffentlichung der DNA-Sequenz von <i>Drosophila melanogaster</i> .
2007	UAS-dsRNA Stammsammlungen werden verfügbar, die Sequenz von 12 <i>Drosophila</i> Spezies ist verfügbar. PhiC31 Transgenesis.
2013	Erste CRISPR Mutagenese in <i>Drosophila</i> .

## Historisches

Als vor mehr als 100 Jahren die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Untersuchungsobjekt in das Labor von THOMAS HUNT MORGAN (1866-1945) einzog, ahnte wohl noch niemand, welchen Siegeszug dieser Organismus sowohl in Forschung als auch Lehre durchlaufen würde. Schnell wurde mit Hilfe dieser Tiere der Genbegriff gefestigt und nach Isolation der ersten Mutationen (die erste gefundene *Drosophila*-Mutation war *white*, eine rezessive X-chromosomale Mutation, die zu weißen Augen führt), konnte bereits 1913 von ALFRED STURTEVANT (1891-1970), einem Schüler von T.H. MORGAN, die erste Genkarte gezeichnet werden, die eine lineare Abfolge der Gene auf dem Chromosom darlegt. 1915 haben T.H. MORGAN und A. STURTEVANT zusammen mit CALVIN BRIDGES (1889-1938) das Buch "The Mechanism of Mendelian Heredity" veröffentlicht, das *Drosophila* zu einem der Schlüsselorganismen der Genetik machte.

Viele der uns heute vertraut und selbstverständlich erscheinenden Grundlagen wurden an *Drosophila* erarbeitet. Der Erfolg hatte eine Reihe von Gründen: Die Taufliegen sind klein, sehr leicht im Labor zu halten und stellen keine großen Ansprüche an die Zuchtbedingungen. Darüber hinaus erwies es sich als Glücksfall, dass das Genom von *Drosophila* aus nur 4 Chromosomenpaaren besteht, von denen drei etwa gleich groß sind und das vierte so klein ist und so wenig Gene enthält, dass es in den meisten Kreuzungsexperimenten vernachlässigt werden kann. Die von C. BRIDGES 1935 gezeichneten Polytänchromosomen-Karten werden auch heute noch im Laboralltag verwendet.

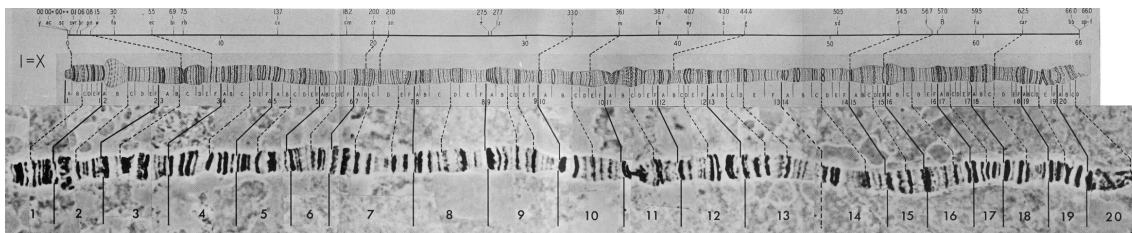


Abbildung 0 Chromosomenkarte des X-Chromosomes von Bridges 1935 (oben) kombiniert mit einer mikroskopischen Aufnahme (unten).

Heute erscheint uns *Drosophila* als gläserner Organismus: Das Genom ist vollständig sequenziert, eine sehr große Zahl von Mutationen ist beschrieben und über verschiedene Stammsammlungen frei verfügbar (<http://flybase.org/>). Inzwischen erlauben CRISPR und verschiedene auf Rekombination beruhende Methoden, die eine fast beliebige Manipulation des Genoms und damit eine relativ einfache Analyse selbst komplexester Fragestellungen, wie die nach der genetischen Steuerung von Verhaltensmustern (z.B. Aggressivität), ermöglichen.

## Technische Entwicklungen

Die Methoden der klassischen Genetik sind in den letzten Jahrzehnten durch rekombinante DNA-Technologien massiv erweitert worden. Bereits in den ersten Tagen der Molekulargenetik wurde 1969 von JOSEPH G. GALL und MARY-LOU PARDUE die in situ Hybridisierung an Polytänchromosomen entwickelt. Die Hybridisierungstechniken wurden verfeinert, bis 1983 MICHAEL AKAM die direkte Visualisierung der Genexpression in der sogenannten „whole mount in situ Hybridisierung“ gelang. 1982 wurde von GERALD RUBIN und ALLAN SPRADLING die Keimbahntransformation etabliert, die heute Routine geworden ist. 1989 wurde von KENT

GOLIC und SUSAN LINDQUIST eine Methode eingeführt die eine Rekombinase der Hefe nutzt (FRT/FLP-Methode), die es erlaubt, eine mitotische Rekombination zu einem definierten Zeitpunkt an einer spezifischen Position zu induzieren. Dies erlaubt z.B. Aussagen zur Autonomie von Genfunktionen zu machen. Die Verwendung der MARCM Technik erlaubt es mutante Zellklone selektiv zu markieren (Gal4/Gal80 Kombination). In Stammsammlungszentren sind inzwischen mehr als die Hälfte der 13.500 Gene durch Transposon-Insertionen markiert und so einer detaillierten Analyse einfach zugänglich. Darüber hinaus können Mutationen in jedem Gen leicht über CRISPR hergestellt werden (sogar innerhalb eines Kurses).

1993 wurde die GAL4/UAS Methode entwickelt, die es ermöglicht, ein Gen zu beinahe jedem Zeitpunkt in jeder beliebigen Zelle zu exprimieren oder mit Hilfe von CRISPR oder RNA Interferenz, zu inaktivieren. Die Verwendung des Gal80<sup>ts</sup> Systems erlaubt eine zusätzliche temperaturgesteuerte Expression. Die Gal4 / UAS-vermittelte Expression von dsRNA erlaubt inzwischen, dass jedes Gen zu einem definierten Zeitpunkt ausgeschaltet werden kann. In Bloomington, Wien und Kyoto sind große Stammsammlungen etabliert, in denen transgene Fliegen gehalten werden, die ein UAS-dsRNA Konstrukt für jeweils jedes Gen tragen (<https://bdsc.indiana.edu/>; [www.vdrc.at](http://www.vdrc.at); [www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly](http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly)).

Heute liegen die Sequenzen der Genome von 12 Drosophiliden und vielen weiteren Insekten vor, so dass vergleichende Analysen sehr schnell durchgeführt werden können. Die Klonierungen auch von großen DNA Fragmenten werden durch PCR, Recombineering Methoden immer einfacher und oft kann man die Sequenzen einfach synthetisieren lassen. Die Herstellung transgener *Drosophila* ist durch die Verwendung des Rekombinationssystems des Phagen  $\phi$ C31 Systems stark vereinfacht worden. Wir können Gene nach ihrem Expressionsmuster identifizieren. Hier findet die folgenden Methoden Anwendung: single cell mRNA-seq (scRNAseq, Detektion alle RNAs in einer Zelle), Enhancer trap (Aktivität einzelner Enhancer), Exon trap oder gene trap Methode. Für *Drosophila* sind die MiMIC Insertionen von Bedeutung bei denen mit Hilfe von recombination-mediated cassette exchange (RMCE) an einem Genort beliebige Sequenzen schnell und einfach eingefügt werden können. In vivo Studien im Nervensystem werden durch Optogenetik und Thermogenetik komplementiert. Hier werden, durch Licht oder Temperatur gesteuert, verschiedene Prozesse in der Zelle ausgelöst, z. B. Einstrom von Ionen Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, die das Membranpotential oder den pH ändern), Lokalisation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern, Aktivierung von Enzymen). Wir sind heute also an einem Punkt angekommen, an dem uns die Methodenvielfalt ein sehr tiefgreifendes Verständnis von sehr komplexen Funktionszusammenhängen erlaubt.

## Biologische Fragestellungen

Mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila* und der an und mit ihm entwickelten molekulargenetischen Methoden konnten einige der wichtigsten Fragen der Entwicklungsbiologie und Genetik beantwortet werden. Durch die Aufdeckung der Mechanismen, die den zeitlich und räumlich geordneten Differenzierungsprozessen eines höheren Eukaryoten zugrunde liegen, wurde erstmals ein theoretischer und praktischer Zugang zur Beantwortung der Frage nach den entwicklungsgenetischen Prinzipien der Ontogenese geschaffen. Ausgehend von diesen Befunden eröffnen sich nun nicht nur neue aufregende Fragestellungen, sondern auch neue Möglichkeiten experimentelle Antworten zu finden.

Wodurch wird das Entwicklungsschicksal unterschiedlicher Zellen bestimmt? Wie können relativ einfach gebaute Zellen so hochkomplexe Gewebe wie z.B. ein Nervensystem aufbauen? Woher wissen die sich bildenden Neurone in welche Richtung sie wachsen müssen, um Reize aufzunehmen oder weiterzuleiten? Wie können Gene das Verhalten eines Individuums beeinflussen?

### Verfügbare Ressourcen

In FlyBase (<http://flybase.org/>) Informationen zur Genomsequenz, den verfügbaren cDNA Klonen und deren Expressionsmustern sowie alle relevante Publikationen. Ressourcen außerhalb der FlyBase sind ebenfalls dort gelistet und werden laufend aktualisiert.

Beispiele:

Über das *Resource Center* (<http://dgrc.cgb.indiana.edu/>) kann man die cDNA Sequenzen, Vektoren etc. beziehen.

Im *Bloomington Drosophila Stock Center* (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) werden alle wichtigen Mutanten, GAL4 Stämme, P-Element Stämme, FRT Stämme Balancer Defizienz- und Duplikationsstämme gehalten und auf Wunsch zugeschickt.

Weitere Sammlungen von Fliegenstämmen sind in Japan (<http://www.dgrc.kit.ac.jp/en/index.html>) in Yale ([http://flytrap.med.yale.edu/flytrap.php?user\\_level=Novice](http://flytrap.med.yale.edu/flytrap.php?user_level=Novice)) oder in Münster verfügbar.

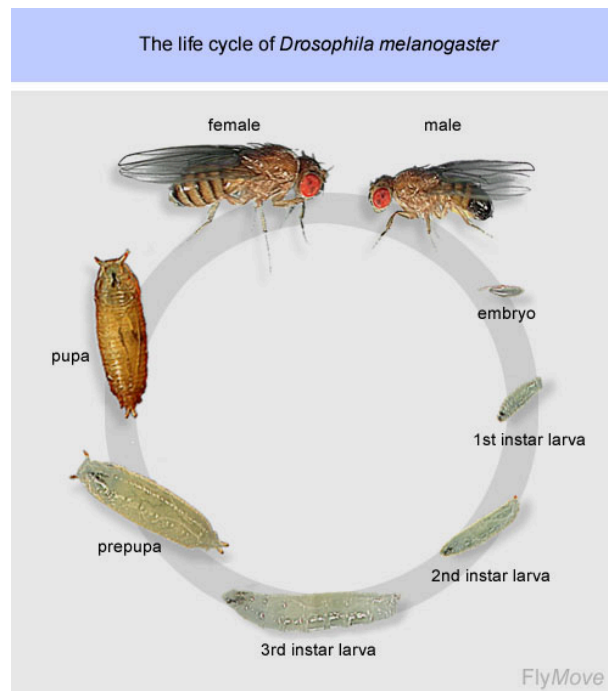
Bei der *Hybridoma-Bank* (<http://www.uiowa.edu/~dshbwww/>) sind viele monoklonale Antikörper gegen *Drosophila* Proteine erhältlich.

### Drosophila Entwicklungsbiologie im Internet

Eine weitere Möglichkeit, sich mit der Embryogenese weiter vertraut zu machen und die komplexen morphogenetischen Bewegungen eingehender zu verfolgen, bietet das WWW-Projekt "FlyMove" (<http://flymove.uni-muenster.de>). Dort findet sich auch eine umfassende Darstellung der verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Zusammen mit der Datenbank "Interactive Fly" (<https://www.sdbonline.org/sites/fly/aimain/1aahome.htm>), die eine Beschreibung vieler Genfunktionen enthält (keine Bilder) und der Datenbank "FlyBase", die eine genaue Beschreibung der Gene/Sequenzen enthält, kann man sich einen sehr guten und aktuellen Überblick über die Möglichkeiten verschaffen, die das *Drosophila*-System bietet.

## Lebenszyklus

*Drosophila melanogaster* ist ein holometaboles Insekt; die Larvalstadien und das Adult- oder Imaginalstadium sind durch die während der Verpuppung stattfindende Metamorphose getrennt (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *Drosophila*.** *Drosophila* gehört zu den holometabolen Insekten mit vollständiger Metamorphose. (siehe <http://flymove.uni-muenster.de/>)

Die Weibchen legen bis zu 100 Eier pro Tag, die etwa 500  $\mu\text{m}$  lang sind und einen Durchmesser von etwa 200  $\mu\text{m}$  aufweisen. Das Ei zeigt bereits deutlich eine anterior-posteriore sowie eine dorso-ventrale Polarität (Abbildung 1). Bei einer Temperatur von 25°C entwickelt sich aus dem Ei innerhalb eines Tages eine Larve. Diese ist deutlich segmentiert: neben 3 eingestülpten und damit verborgenen Kopfsegmenten sind 3 thorakale und 8 abdominale Segmente sichtbar. Das erste Larvenstadium dauert wiederum etwa einen Tag, danach häutet sich die Larve und lebt für einen weiteren Tag im zweiten Larvalstadium. Nach einer erneuten Häutung bleibt die Larve für 2-3 Tage im dritten Larvenstadium. Alle Larvenstadien sind von einem enormen Größenwachstum begleitet. Innerhalb nur weniger Tage nimmt das Gewicht um das etwa 200-fache zu. Am Ende des dritten Larvenstadiums setzt die Wanderschaft (Wanderlarve) ein, in der ein trockener Platz zur Verpuppung gesucht wird. Anschließend kontrahiert sich die Larve allmählich und die vorderen Enden der beiden Haupt-Tracheen, die sogenannten anterioren Spirakel, werden nach außen gestülpt. Die larvale Kutikula wird zur Puppenhülle (Puparium) umgebildet, wobei sie zunächst noch weiß und weich ist, und innerhalb von 2 Stunden eine braune Farbe annimmt und aushärtet (Vorpuppe). 4-6 Stunden nach Bildung des Pupariums löst sich die Epidermis von der Puppenhülle (Apolysis) und die Puppe wird während einer weiteren Häutung innerhalb des Pupariums gebildet.

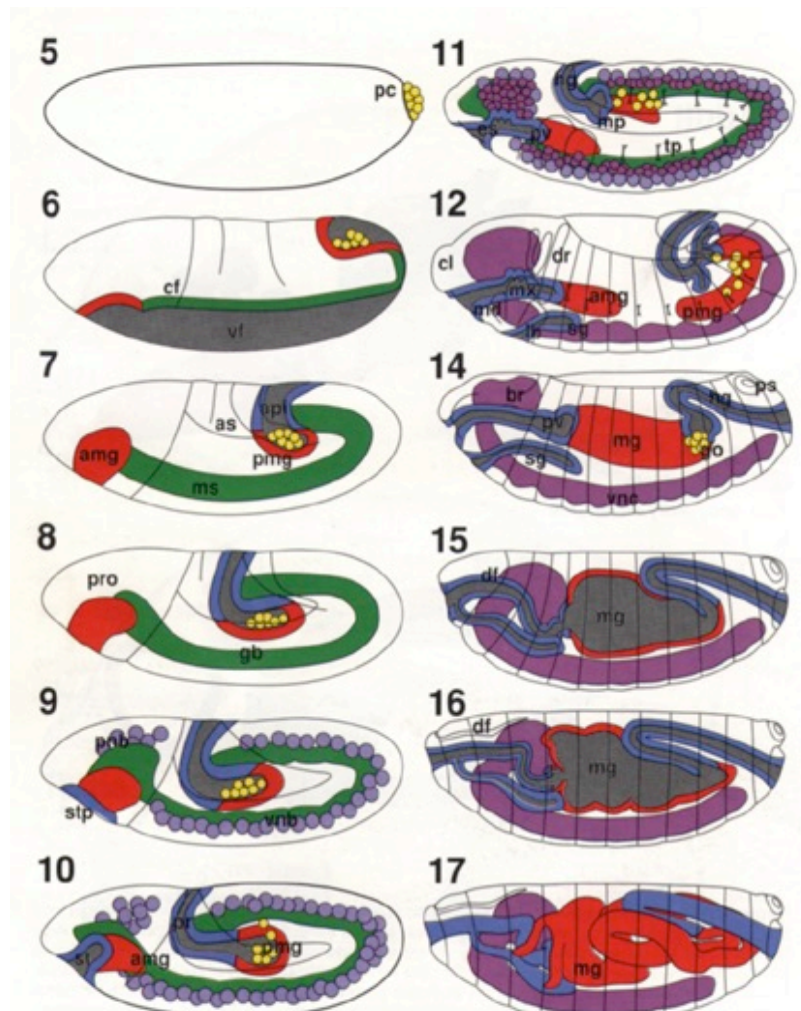
Innerhalb des 5 Tage dauernden Puppenstadiums wird der Organismus komplett umgebildet (Metamorphose). Während der Metamorphose werden einige Organe vollständig abgebaut (z. B. Fettkörper, Speicheldrüsen) andere werden umorganisiert (z. B. Malpighische Gefäße, Gehirn), wieder andere werden neu gebildet (z.B. die äußeren Strukturen der Fliege, die fast alle aus den sogenannten Imaginalscheiben entstehen).



In der Regel schlüpfen die Fliegen in den frühen Morgenstunden des 5. Tages nach der Verpuppung und sind bei einer Entwicklungstemperatur von 25°C schon nach etwa 4 Stunden geschlechtsreif. Der gesamte Generationszyklus dauert bei 25°C also nur ca. 10 Tage. Allerdings ist die Entwicklungszeit stark temperaturabhängig, was für den Genetiker von großer praktischer Bedeutung ist. So kann beispielsweise nach einer Absenkung der Zuchttemperatur auf 18°C der Beginn der Geschlechtsreife auf etwa 24 Stunden nach dem Schlüpfen der Fliegen aus der Puppenhülle gedehnt werden. Dies erleichtert die tägliche Kreuzungsarbeit enorm, da unbefruchtete (virginelle) Weibchen zum gezielten Weiterkreuzen nicht alle 4 Stunden aus einem Zuchtgefäß abgesammelt werden müssen. Je nach Haltungsbedingungen können *Drosophila* Fliegen 2-3 Monate alt werden.

## Embryonalentwicklung

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Befruchtung und ist in 17 verschiedene Stadien eingeteilt worden (siehe Abbildung 2). Während der ersten 2,5 Stunden der Entwicklung finden



**Abbildung 2: Die verschiedenen Stadien der *Drosophila* Embryonalentwicklung.** Anterior ist links. Rot Endoderm, Mitteldarm, Lila CNS, Blau Vorder- Hinterdarm, Gelb Polzellen (pc). amg anterior midgut, mg midgut, hg hindgut, cf cephalic furrow, go gonads, lb labial bud, mx maxillary bud, ps posterior spiracle, tp tracheal pits, pv proventriculus, vf ventral furrow, vnb ventral neuroblasts, vnc ventral nerve cord

13 sehr schnelle synchrone Kernteilungen statt. Bis auf einige wenige Kerne, die im Zentrum verbleiben (sogenannte Vitellophagenkerne), wandern die meisten in die Peripherie der Eizelle.

Es liegt ein Synzytium vor, d.h. es sind noch keine Zellmembranen um die einzelnen Kerne eingezogen worden. Die ersten vom Embryo gebildeten Zellen sind die sogenannten Polzellen, die sich nach ca. 2 Stunden am posterioren Pol abschnüren. Anschließend findet auch die Zellularisierung der restlichen peripheren Kerne statt, was zum sogenannten zellulären Blastoderm-Stadium (Stadium 5) führt. Bis zu diesem Zeitpunkt findet im Embryo kaum Transkription statt. Die meisten Genprodukte, die diese frühen Entwicklungsschritte steuern sind bereits vor der Befruchtung vom mütterlichen Genom (maternale Gene) in der Eizelle deponiert worden. So wird auch die genetische Festlegung der Körperachsen durch maternale Informationen gesteuert. Ab dem zellulären Blastoderm-Stadium setzt die zygotische Genexpression ein. Die Segmentierungsgene (Gap-Gene, Paarregel-Gene, Segmentpolaritätsgene) unterteilen den Körper in die verschiedenen Segmente.

Anschließend beginnt die Gastrulation. Die auf der Ventralseite liegenden präsumptiven Mesodermzellen verlagern sich in das Innere des Embryos. Gleichzeitig streckt sich der später sichtbar segmentierte Teil des Embryos, der auch als Keimstreif bezeichnet wird und umwächst den posterioren Pol, um schließlich eine U-förmige Position einzunehmen. Nach ca. 4 Stunden (Stadium 9) beginnen sich die Anlagen des Vorder- und Enddarms einzustülpen. Mit diesen werden auch die beiden Primordien, die den späteren Mitteldarm bilden, ins Innere verlagert. Die Polzellen liegen nun in einer von der posterioren Mitteldarmanlage gebildeten Tasche. Nach der Ausstreckung des Keimstreifes wird die Segmentierung zunächst im Kopfbereich sichtbar. Sobald die segmentale Organisation des Embryos deutlich erkennbar ist, beginnt die Keimstreif-Verkürzung (Stadium 12). Gleichzeitig wächst die laterale Epidermis nach dorsal aus und umschließt den sich bildenden Mitteldarm. Nachdem der Embryo dorsal geschlossen ist, wird die zunehmende Unterteilung des Mitteldarms ein wichtiges Kriterium für die Altersbestimmung der Embryonen. Die Entwicklung des Nervensystems beginnt nach der Keimstreifausstreckung und endet kurz vor Schlüpfen der Larve. Die wichtigsten Stadien sind in der Abbildung 2 zusammengefasst. Bei 20°C dauert die Embryonalentwicklung etwa 24 Stunden, bei 18°C etwa 40 Stunden (Campos-Ortega, 1997).

## **Larvalentwicklung**

Einen Tag nach dem Schlüpfen der Larve aus dem Ei findet die erste Häutung statt, nach einem weiteren Tag die zweite Häutung. Das dritte Larvenstadium (L3) dauert 2-3 Tage. Die Häutungen werden hormonell, durch unterschiedliche Titer von Juvenilhormon und Ecdyson, gesteuert. Während der Larvalstadien wächst die Larve enorm, wobei die Größenzunahme im Wesentlichen nicht durch Zellvermehrung, sondern durch Zellwachstum hervorgerufen wird. Diese außerordentliche Syntheseleistung wird durch eine Polyploidisierung der larvalen Zellkerne ermöglicht. Etwa 24 h vor Einsetzen der Verpuppung beginnt die Larve aus dem Futterbrei herauszukriechen. Während im Verlaufe der Metamorphose fast alle differenzierten larvalen Zellen zugrunde gehen, werden die Strukturen der Imagines von diploiden, undifferenzierten Zellen neu gebildet. Diese Zellen wurden bereits im Embryo bzw. in der frühen Larve in Form von Imaginalscheiben, imaginalen Ringen und Histoblasten-Nestern angelegt.

Aus den Histoblasten werden die ektodermalen Zellen des Abdomens gebildet. Alle weiteren ektodermalen Zellen, wie zum Beispiel die des peripheren Nervensystems, leiten sich aus den Imaginalscheiben ab. Ein prominentes Beispiel ist hier die Entwicklung des adulten Komplexauges aus der Augen-Antennen-Imaginalscheibe.



Das Schicksal der späteren Imaginalscheiben wird bereits in der Mitte der Embryonalentwicklung determiniert. Hier werden jeweils ca. 16 ektodermale Zellen eingestülpt die eine „Sack“-ähnliche Struktur ausbilden. Die eine Hälfte dieser Einstülpung wird zur sogenannten Peripodialmembran und besteht aus flachen, breitgestreckten (squamosen) Zellen. Die andere Hälfte der Zellen behält die säulenförmig Struktur (collumär) und proliferiert stark während der larvalen Entwicklungsstadien.

In der Augen-Antennen-Imaginalscheibe beginnt am Ende des 3ten Larvalstadiums die Entwicklung des Komplexauges. Das Komplexauge von *Drosophila* setzt sich aus etwa 750 bis 800 Einzelaugen – den Ommatidien – zusammen. Jedes einzelne Ommatidium besteht aus 8 Photorezeptorzellen (R1- R8), 4 Linsenzellen und verschiedenen Pigmentzellen. Die Methoden der klassischen und modernen Genetik haben zu einem detaillierten Verständnis der diesem Entwicklungsprozess zu Grunde liegenden Mechanismen geführt: Während des dritten Larvalstadiums wandert eine epitheliale Einsenkung, die sogenannte Morphogenetische Furche, von posterior nach anterior über die Imaginalscheibe. In dieser Furche werden zunächst in einem regelmäßigen Abstand die R8 Photorezeptorzellen determiniert. Diese rekrutieren anschließend im Kielwasser der Furche über direkte Zell-Zell Interaktionen die weiteren Zellen des Ommatidiums. Hierbei lässt sich eine sequentielle Abfolge beobachten; zunächst beginnen die Zellen R2 und R5, anschließend die Zellen R3 und R4 mit der neuronalen Differenzierung. Nachdem sich diese 5er Gruppe gebildet hat, teilen sich die umliegenden epithelilalen Zellen. Aus dem nun vorhandenen Zellpool werden dann die Rezeptorzellen R1 und R6 und schließlich die Rezeptorzelle R7 rekrutiert. Die Linsenzellen werden ebenfalls noch während der Larvalentwicklung gebildet, während die Pigmentzellen in der Puppe in die ommatidialen Einheiten eingegliedert werden (Bate und Martinez Arias, 1993).

## Fliegen haben ein Exoskelett

Ein wichtiges Untersuchungskriterium des Modellorganismus *Drosophila* ist das reich strukturierte Exoskelett, das als Kutikula von der Epidermis abgeschieden wird (Demerec, 1994). Es erlaubt sowohl bei Larven als auch Fliegen eine einfache Unterscheidung vieler verschiedener Merkmale und hat damit die genetische Analyse von *Drosophila* erst möglich gemacht. Vor Beginn der Kreuzungsexperimente muss zunächst die Unterscheidung von Männchen und Weibchen erlernt werden. Neben den unterschiedlichen Geschlechtsorganen sind leichte Größenunterschiede der Augen und Flügel festzustellen, die bei den Männchen kleiner ausgeprägt sind. Bei der ersten Betrachtung werden diese Merkmale nicht auffallen, jedoch wird man nach ein wenig Übung den Unterschied einfach erkennen. Weiterhin sind bei den Männchen die 3 letzten Abdominalsegmente in der Aufsicht komplett schwarz, während bei den Weibchen nur die beiden letzten Segmente einfarbig schwarz gefärbt sind. Ein sicheres zusätzliches Merkmal sind die sogenannten Geschlechtsskämme ('Sex combs'), die sich auf dem ersten Beinpaar der Männchen befinden. Die 'Sex combs' sind – wie auch alle anderen Borsten der Fliege – Teile von sensorischen Organen. Man sollte daher nie den Begriff "Haare" verwenden (Haare sind nicht innervierte Fortsätze einzelner Epidermis-Zellen). Die Makrochaeten (große Borsten) und Mikrochaeten (kleine Borsten) sind in einem sehr regelmäßigen Muster auf dem Notum der Fliege angeordnet, welches sich aus dem Scutum (Rückenschild) und dem Scutellum (kleines Rückenschild hinter dem Scutum) zusammensetzt (Abbildung 16,19). Diese stereotype Anordnung ist u.a. für die Analyse der genetischen Steuerung der Neurogenese von großer Bedeutung.

Auch die Larve weist eine Vielzahl von kutikulären Markern auf, die z.B. eine Unterscheidung zwischen verschiedenen abdominalen Segmenten oder zwischen dorsalen und ventralen Körperregionen erlauben. In der Abbildung 20 sind die wichtigsten Marker eingezeichnet. Das prominente Kopfskelett markiert das anteriore Ende der Larve, die ventralen Zähnchenbänder, die stets im anterioren Bereich eines Segments liegen, erlauben die Identifizierung der verschiedenen Segmente und erleichtern eine Bestimmung der Position innerhalb eines Segmentes. Die umfassende Analyse mutanter larvaler Kutikulastrukturen hat zu bahnbrechenden Erkenntnissen über die genetische Steuerung der Embryonalentwicklung geführt, für die CHRISTIANE NÜSSLEIN-VOLHARD und ERIC WIESCHAUS 1995 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet worden sind.

## Drosophila-Genetik

Die kurze Generationszeit, die leichte Handhabbarkeit, das reich strukturierte Exoskelett und die Riesenchromosomen haben den Siegeszug von *Drosophila melanogaster* als ein beliebtes und viel benutztes Objekt der klassischen Genetik ermöglicht. T.H. MORGAN, H.J. MULLER, A. STURTEVANT und C. BRIDGES haben die Befunde von GREGOR MENDEL aufgegriffen und bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts die wesentlichen Aussagen der klassischen Genetik erarbeitet. Heute ist *Drosophila* mit seinen vielfältigen genetischen und molekulargenetischen Möglichkeiten zu einem wichtigen Modellsystem für weite Bereiche der Lebenswissenschaften geworden.

### Grundbegriffe der Drosophila-Genetik

Zunächst sollen einige wichtige Grundbegriffe definiert werden. *Drosophila* ist ein diploider Organismus, d.h. fast alle Gene liegen in zwei Kopien vor. Eine Ausnahme stellen die heterosomalen Gene beim Männchen dar. Die Diploidie erschwert die Analyse von Erbgängen, da nicht immer – wie bei haploiden Organismen – vom Phänotyp eindeutig auf den Genotyp geschlossen werden kann. Organismen in der freien Natur weisen normalerweise einen einheitlichen Phänotyp auf, der als Wildtyp bezeichnet wird. Der einheitliche Phänotyp lässt auf einen weitgehend einheitlichen Genotyp schließen, d.h. die meisten der Gene liegen in identischen Allelen vor: Für diese Gene wird der Genotyp als  $+/+$  abgekürzt.

Ein Gen kann in unterschiedlichen Erscheinungsformen ausgeprägt sein, die wir als Allelformen bezeichnen. In der Sprache der Genetik wird dies wie folgt geschrieben:

$$a^1/a^2 \quad \text{Man spricht von } a^1 \text{ über } a^2.$$

Der Buchstabe entspricht dem Gennamen, die hochgesetzten Zeichen spezifizieren das Allel. Mutationen in einem Gen werden als rezessiv klassifiziert, wenn sich ein Phänotyp nur dann ausprägt, wenn das Allel homozygot vorliegt. Ist das erste gefundene Allel eines Gens rezessiv gegenüber dem Wildtyp, beginnt der Genname mit einem kleinen Buchstaben (auch am Satzbeginn). Wenn ein Allel als dominant klassifiziert wird, prägt sich der Phänotyp auch im heterozygoten Zustand aus. Ein Gen, dessen erste beschriebene Mutation dominant gegenüber dem Wildtyp war, erhält einen Namen mit großem Anfangsbuchstaben.

Die meisten der untersuchten Allele wurden durch Mutagenese-Experimente erzeugt. Wir sprechen von einer Mutagenese, wenn Gene verändert werden. Das Mutagen kann z.B. Röntgenstrahlung, ein mobiles DNA-Element (Transposon) oder eine DNA-modifizierende Chemikalie sein. Mutagenesen dieser Art sind in der Regel ungerichtet! D.h. wir müssen aus den vielen zufällig induzierten Mutationen die für die jeweilige Fragestellung interessanten Kandidaten herausuchen.

In den letzten Jahren haben sich die Technologien für gerichtete Mutagenesen enorm weiterentwickelt. TALEN und CRISPR sind hier die aktuellsten und vielversprechensten Beispiele, die auch in *Drosophila* anwendung finden.

### Mutationstypen

Die einfachste Art ein Gen zu verändern ist, es physikalisch zu entfernen. Wir sprechen dann von einer Defizienz (Df). Wenn ein Gen vollständig fehlt, sprechen wir auch von einem

Nullallel oder amorphen Allel. Um zu bestimmen, ob eine Mutation tatsächlich zu einem vollkommenen Verlust der Genfunktion führt, wird der Phänotyp des homozygoten Allels mit dem Phänotyp verglichen, der sich ergibt, wenn das Allel heterozygot über der Defizienz dieses Gens vorliegt (Heterozygose). Sind beide Phänotypen gleich, liegt ein amorphes Allel vor.

Man kann sich natürlich auch vorstellen, dass ein Gen nur einen mehr oder weniger kleinen Teil seiner Funktion eingebüßt hat. Solche Mutationen werden auch als hypomorphe Mutationen bezeichnet. Dies wird z.B. nach Punktmutationen häufig beobachtet. Der Phänotyp eines homozygoten hypomorphen Allels ist schwächer als in Heterozygose über der Defizienz des Gens, das heißt, die Tiere prägen einen Phänotyp aus, der zwischen dem Phänotyp des amorphen Allels und dem Wildtyp liegt.

Da sowohl amorphe als auch hypomorphe Mutationen zu einem Funktionsverlust gegenüber der Wildtyp-Situation führen, werden diese Mutationen im Englischen als „loss of function“ bezeichnet und oft mit LOF abgekürzt.

Eine Mutation kann aber auch eine Verbesserung der Genfunktion bewirken, z.B. könnte die Aktivität eines Enzyms nach Mutation erhöht sein, ein Transkriptionsfaktor könnte seine DNA-Zielsequenz besser binden oder ein Strukturprotein stabiler und länger haltbar sein. In solchen seltenen Fällen führt das Mutationsereignis zu einem hypermorphen Allel. Ein solches Allel wird auch als „gain of function“ Allel, abgekürzt GOF, bezeichnet. Um festzustellen, ob eine Mutation zu einem hypermorphen Allel geführt hat, wird der Phänotyp in Heterozygose über der Defizienz bzw. der Duplikation des jeweiligen Gens analysiert.

Eine Mutation kann auch zu einer gänzlich neuen Genfunktion führen. Dies kann z.B. durch eine Veränderung des Ortes der Genexpression erfolgen (Enhancer-Mutationen, regulatorische Mutationen). Wenn beispielsweise ein Gen, das die Entwicklung des Beins steuert, nach Mutation in der Antenne exprimiert wird, wird dort statt einer Antenne ein Bein gebildet (z.B. *Antennapedia* Mutante). Wir sprechen von einer neomorphen Mutation, die sich unabhängig vom Genotyp des zweiten Allels ausprägt.

Schließlich können Mutationen auch entgegengesetzt zur normalen Funktion wirken. Sie werden dann als dominant negativ bezeichnet und man spricht von antimorphen Allelen. Über einer Duplikation wird der Phänotyp abgeschwächt.

Mutationstyp	Phänotyp	Ausprägung
Amorph	keine Funktion	$a/a = a/Df$
Hypomorph	weniger Funktion	$a/a < a/Df$
Hypermorph	mehr Funktion	$a/a > a/+ > a/Df$
Neomorph	neue Funktion	$a/+ = a/Df = a/Dup$
Antimorph	antagonistische Funktion	$a/+ > a/Dup$

**Tabelle: Mutationstypen und ihre Auswirkungen**

Legende: a = mutantes Allel; Df = Defizienz; Dup = Duplikation. Bsp.: Ein homozygot vorliegendes Allel ( $a/a$ ) wird einen schwächeren mutanten Phänotyp (hypermorph) ausprägen als heterozygot über einer Defizienz ( $a/Df$ ). Warum? Versuchen Sie sich im Gedankenexperiment, unter Verwendung beliebiger selbstgewählter Mutationen, klar zumachen, wie man anhand der unterschiedlichen Ausprägungen auf die zugrunde liegenden Mutationstypen schließen kann.

## Chromosomale Aberrationen als Hilfsmittel der Genetik

Chromosomen-Mutationen oder chromosomale Aberrationen sind mehr oder weniger umfangreiche Umstellungen in der Reihenfolge ganzer Chromosomenabschnitte. Um sie zu erzeugen, müssen zunächst z.B. durch Röntgenstrahlung DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden. Manchmal werden diese anschließend irregulär repariert, was zu einer Rekombination an nicht-homologen Positionen des gleichen Chromosoms oder mit einem nicht-homologen Chromosom führt. Voraussetzung hierfür ist eine räumliche Nähe der beteiligten Chromosomenabschnitte. Der Entstehungsmechanismus von chromosomalen Aberrationen ist daher als illegitimes Crossover zu verstehen. Im Fall von *Drosophila* können Aberrationen, die mehr als 100 kb umspannen, an irregulären Abfolgen der typischen Bandenmuster der Polytänchromosomen leicht erkannt werden. Man unterscheidet die folgenden Chromosomen-Mutationen.

**Defizienzen** Abkürzung: Df(n)Name (n steht für Chromosomenarm, z.B. 3L; 3. Chr., linker Arm)

**Duplikationen** Abkürzung: Dp(n)Name

**Translokationen** Abkürzung: T(n;m)Name

**Ring-Chromosomen** Abkürzung: R(n)Name

**Inversionen** Abkürzung: In(n)Name

## Balancer-Chromosomen

Sehr viele der in den Stammsammlungen vorhandenen Mutationen führen in Homozygose zu Letalität oder Sterilität, d.h. sie resultieren in einem schlechten Überleben oder in geringen Nachkommenzahlen. Solche Mutationen müssen also heterozygot gehalten werden. Um zu verhindern, dass die Mutationen mit wildtypischen Allelen des homologen Chromosoms rekombinieren, verwendet man eindeutig markierte Balancer-Chromosomen als "Gegenchromosomen".

Diese Chromosomen müssen die folgenden Kriterien erfüllen:

A) Sie tragen mehrere, z.T. kompliziert ineinander verschachtelte Inversionen, wodurch die in der Meiose der Weibchen generierten Rekombinationsprodukte eliminiert werden. Die Namensgebung lässt das durch die Inversionen betroffene Chromosom erkennen: First Multiple (FM), ein Balancer für das erste Chromosom, Second Multiple (SM) und Third Multiple (TM) für das zweite und dritte Chromosom.

B) Sie tragen eine oder mehrere dominante Markermutationen, um ihr Vorhandensein in einem gegebenen Individuum auch in Heterozygose eindeutig nachweisen zu können (z.B. die Mutation Curly (Cy) auf dem 2. Chromosom, die zu gebogenen Flügeln führt).

C) Autosomale Balancer-Chromosomen tragen rezessive Letalfaktoren, die homozygote Balancer-Tiere verhindern. Im Fall der Heterosomen ist die Letalmarkierung natürlich nicht möglich, da das Balancer-Chromosom sonst nicht über die (hemizygoten) Männchen weitergegeben werden könnte. In diesem Fall werden in der Regel rezessive „female sterile“ Mutationen verwendet. Homozygote (=Weibchen) Balancer-Tiere gibt es zwar, aber diese Tiere sind steril. Mit Hilfe der Balancer-Chromosomen kann man Mutationen über beliebig viele Generationen stabilisieren.

## Häufig verwendete Balancer

<b>FM7c</b>	In(1)FM7, $y^{31d}$ $sc^8$ $w^a$ $sn^{X2}$ $v^{Of}$ $g^4$ $B^1$ (First multiple #7)
<b>CyO</b>	In(2LR)O, <i>Cy</i> $dp^{lv}$ <i>pr</i> $cn^2$ Achtung! Der Marker <i>Cy</i> ist temperatursensitiv und prägt sich bei niedrigen Temperaturen nicht aus
<b>TM2</b>	In(3LR)Ubx <sup>130</sup> , $emc^2$ Ubx <sup>130</sup> $e^s$ (Third multiple #2)
<b>TM3</b>	In(3LR)TM3, $y^+$ <i>ri</i> $p^p$ <i>sep</i> $l(3)89Aa$ $bx^{34e}$ $e$ (Third multiple #3)
<b>TM3, Sb</b>	zusätzlich mit <i>Sb</i> markiert
<b>TM3, Ser</b>	zusätzlich mit <i>Ser</i> markiert
<b>TM3, Sb Ser</b>	zusätzlich mit <i>Sb</i> und <i>Ser</i> markiert
<b>TM6B</b>	In(3LR)TM6B, <i>Hu</i> $e$ <i>Tb</i> (Third multiple #6)
<b>MKRS</b>	Tp(3;3)MKRS, M(3)76A, <i>kar</i> $ry^2$ <i>Sb</i>

Erklärung einiger Balancer-Marker:

<b>Cy</b>	<b>Curly:</b> Flügel nach oben gebogen
<b>Bl</b>	<b>Bristle:</b> Zweit-chromosomaler Borstenmarker, kürzere Borsten
<b>B</b>	<b>Bar:</b> Nierenförmige Augen. Homozygot deutlich stärker
<b>e</b>	<b>ebony:</b> dunkle Körperfarbe
<b>Hu</b>	<b>Humeral:</b> mehr Humeral-Borsten
<b>Sb</b>	<b>Stubble:</b> kurze, dicke Borsten
<b>sc</b>	<b>scute:</b> Makrochaeten des Thorax fehlen, rezessiv – aber Hemizygotie beachten
<b>Ser</b>	<b>Serrate:</b> Flügel an den Enden eingekerbt
<b>sn</b>	<b>singed:</b> kurze “angesengte” Borsten, rezessiv – aber Hemizygotie beachten!
<b>Sp</b>	<b>Sternopleural:</b> mehr Sternopleural-Borsten
<b>Tb</b>	<b>Tubby:</b> Larven, Puppen und Adulte kürzer als der Wildtyp
<b>Ubx</b>	<b>Ultrabithorax:</b> vergrößerte Halteren, z.T. mit Borsten
<b>w</b>	<b>white:</b> weiße Augen, rezessiv – aber Hemizygotie beachten
<b>y</b>	<b>yellow:</b> gelbe Körperfarbe, rezessiv – aber Hemizygotie beachten

Fast alle Balancer Chromosomen tragen inzwischen zusätzlich einen GFP-Marker.

## Das Gal4 System

Das binäre Gal4/UAS System aus der Hefe erlaubt die Expression eines beliebigen Transgens orts- und gewebespezifisch. Die Gal4 Treiberstämme können auf unterschiedliche Art und Weise generiert werden. Zum einen kann ein (bekanntes oder unbekanntes) Promoterfragment vor Gal4 kloniert werden und das resultierende Konstrukt zur Herstellung von transgenen *Drosophila* verwendet werden. Zum anderen kann ein neutraler Promoter verwendet werden, der nur über eine basale Promoteraktivität verfügt. Wenn Gal4 unter der Kontrolle eines derartigen Promoters geschaltet ist, kommt es nur dann zu einer nennenswerten Expression,

wenn das entsprechende Konstrukt unter die zusätzliche Kontrolle eines Enhancers kommt. Die sogenannte Enhancer trap Technik macht sich dieses zu Nutze und bringt z.B. Gal4 kodierende Konstrukte zufällig in das Genom ein.

Die UAS (Upstream Activating Sequence) erlaubt die Transkription einer beliebigen transgenen DNA-Sequenz, die hinter die UAS eingebracht wird, in der Regel durch Klonierung. Mit dem Suppressor Gal80 ergibt sich eine Modifikationsmöglichkeit des binären Systems. Gal80 bindet die Transkriptionsaktivationsdomäne von Gal4 und reprimiert dadurch Transkription. Gal80 wird heute sowohl gewebsspezifisch als auch temperaturabhängig vielfältig eingesetzt. Das Gal4 System ist das bei weitem meistverwendete heterologe Expressionssystem in *Drosophila* und Grundlage mannigfaltiger Adaptionen (hormongesteuert, MARCM, split-Gal4).

## Klonale Analysen in *Drosophila*

Die Untersuchung von homozygoten Mutanten muss sich nicht auf das Studium homozygot mutanter Tiere beschränken. So möchte man häufig die Effekte einer Mutation für postembryonale Entwicklungsstadien analysieren, obwohl die Mutation selbst bereits im Embryo zur Letalität führt. Hierzu sind zum einen konditionale Mutationen hilfreich, die es z.B. nach Änderung der Zuchttemperatur von der permissiven zur restriktiven Temperatur erlauben, eine Genfunktion zu einem definierten Zeitpunkt auszuschalten. Allerdings sind solche konditionalen Mutationen relativ selten und daher nicht generell anwendbar.

Einen alternativen experimentellen Ansatz stellt die Methode der mitotischen Rekombination dar. Hier wird – früher durch Röntgenstrahlen induziert, heute enzymatisch vermittelt – ein Rekombinationsereignis während der Mitose einer Zelle induziert. Diese Rekombination führt in der Folge zu einer homozygot mutanten und einer wildtypischen Tochterzelle. Die beiden nach dem mitotischen Rekombinationsereignis entstandenen Zellen bilden so genannte Zwillingsflecken oder *twin spots*. Der Organismus vereint nach der mitotischen Rekombination also drei Genotypen: Die heterozygoten Ausgangszellen, die wildtypischen Zellen und die homozygot mutanten Zellen.

Mit Hilfe der Technik der mitotischen Rekombination lässt sich eine Reihe von wichtigen Fragen beantworten. Zum einen kann man den Effekt einer Mutation in späteren Entwicklungsstadien untersuchen. Zum anderen kann die Autonomie der Genfunktion geklärt werden. Was versteht man unter diesem wichtigen Begriff? Eine Genfunktion ist dann zellautonom, wenn der Phänotyp sich stets in der mutanten Zelle ausprägt. Dies ist zum Beispiel für Mutationen in einem membranständigen Rezeptor zu erwarten. Betrifft die Mutation jedoch die Generierung eines diffusiblen Signals (z.B. Hormon), dann kann der Phänotyp eines mutanten Zellklons von den umgebenden Zellen, die dieses Signal nach wie vor noch produzieren können, gerettet werden. Man spricht dann von einem nicht-zellautonomen Verhalten.

Die mitotische Rekombination wurde in den 70er Jahren entwickelt und basierte auf dem Einsatz von Röntgenstrahlen. Diese Methode bringt allerdings eine Reihe von Nachteilen mit sich: Die Ereignisse sind relativ selten, sie treten zufällig ein und der Ort lässt sich nicht vorherbestimmen. Außerdem müssen relativ hohe Röntgendosen verwendet werden. Um all diese Nachteile zu vermeiden, setzt man bei *Drosophila* seit Anfang der 90er Jahre das so genannte FRT / FLP-System ein. Mit Hilfe dieses aus der Hefe stammenden Rekombinationssystem (Die FLP ist eine Sequenz-spezifische Rekombinase, die eine Rekombination an den FRT Sequenzen induziert) ist es möglich, die Effizienz der mitotischen

Rekombination gewaltig zu steigern. Zudem stellt die Generierung von genetischen Mosaiken nur noch ein einfaches Kreuzungsexperiment dar und erfordert keinerlei apparativen Aufwand. Mit Hilfe der P-Element Technologie hat man FRT-Elemente in die Keimbahn von *Drosophila* eingeführt. In einem nachfolgenden Mobilisierungsexperiment hat man anschließend viele neue Insertionen dieses Transposons erhalten. Aus diesen hat man dann die Insertionen ausgewählt, die den Centromeren der fünf wichtigsten Chromosomenarme am nächsten liegen (siehe Stammsammlungszentrum in Bloomington). Neben dem FRT-Element tragen diese Chromosomen weitere Marker, die die genetischen Arbeiten vereinfachen. Bringt man mit Hilfe klassischer Rekombinationstechniken eine Mutation auf ein FRT-Chromosom, kann man die Mutation mit einem Balancer stabil halten und mit Hilfe klassischer Methoden analysieren. Kreuzt man jedoch solche FRT-Stämme gegen einen Stamm, der zusätzlich zu einem FRT-Chromosom ein P-Element Transposon mit dem Flipase Gen (flp) der Hefe trägt, wird in den Nachkommen dieser Kreuzung mitotische Rekombination ausgelöst. Allerdings findet diese nur dort statt, wo die Flp-Rekombinase exprimiert wird. Die Kontrolle der Flp Expression kann über einen Hitzeschock Promoter erfolgen und erlaubt dann eine zeitliche Kontrolle der Induktion der mitotischen Rekombination. Alternativ kann die Flipase unter die Kontrolle eines beliebigen transkriptionellen Enhancers gestellt werden. Hierdurch wird die Rekombination nur in einem bestimmten Gewebetyp induziert. Im Folgenden ist ein Versuch zur effizienten Induktion von Augenklonen beschrieben.

## **Induktion genetischer Mosaik im adulten Nervensystem**

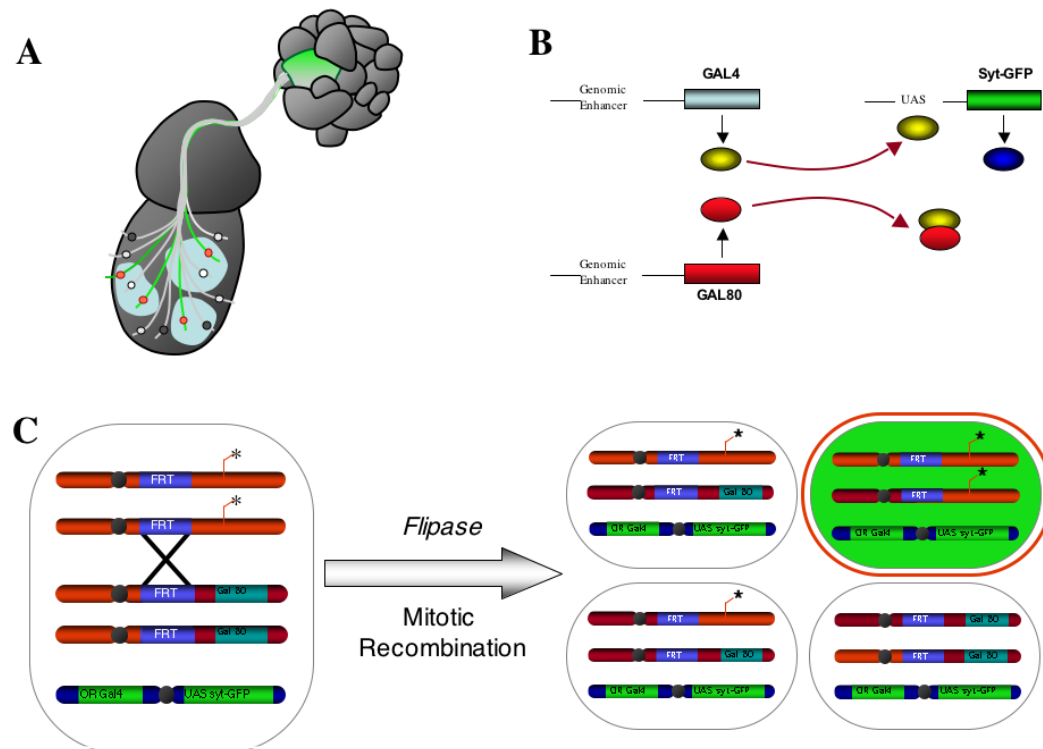
Genetische Mosaiktiere, in denen Bereiche des somatischen Gewebes einen vom Rest des Tieres verschiedenen Genotyp aufweisen, haben sich als sehr hilfreich zur Untersuchung verschiedenster Entwicklungsprozesse erwiesen. So kann man z.B. Mutationen pleiotroper Genfunktionen, die beim Verlust zu einem frühen Entwicklungsstadium zur Letalität des Tieres führen, auch auf ihre Rolle in nachgeschalteten Entwicklungsschritten hin untersuchen, in dem man homozyot mutante Bereiche nur in einer kleiner Anzahl von Zellen induziert. Genetische Mosaik sind zudem ein wirkungsvolles Hilfsmittel, um komplexe Zell-Zell-Interaktionen zu verstehen, in dem man z.B. die Zellautonomie einer Genfunktion im Grenzbereich von wildtypischen und mutanten Zellen analysiert.

In *Drosophila* sind eine Reihe von Techniken zur Erzeugung von Mosaiktieren etabliert. Dazu gehören zum einen Methoden der klassischen Embryologie, wie die Transplantation von Zellen zwischen Fliegen verschiedenen Genotypes, zum anderen rein genetische Manipulationen wie der Verlust ganzer Chromosomen zu einem frühen Teilungsstadium (Gynandromophe) oder die Induktion von mitotischer Rekombination zwischen den Armen homologer Chromosomen. Für letztere stellt die FRT/FLP Technik eine entscheidende Erweiterung dar (Abb. 3). Hierbei kommt es zu einer FLPase („FLP recombinase“) induzierten Rekombination zwischen zwei FRT („FLPase recombination targets“) Elementen, die sich an identischen Positionen auf den homologen Chromosomen befinden (Abb. 3C). Dadurch lassen sich genetische Mosaik mit hoher Frequenz gezielt zu einem definierten Entwicklungszeitpunkt und in abgegrenzten Geweben erzeugen.

Zur Identifizierung der genetischen Mosaikbereiche in einem Tier verwendet man in vielen Fällen das Gal4/UAS Expressionsystem zur zell-autonomen Markierung von Geweben eines definierten Genotypes (siehe „Ektopische Expression von Genen- Das Gal4-System“). In der MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) Technik kombiniert man das



Gal4/UAS Expressionssystem mit dem FRT/FLP Rekombinations-System. Dabei verhindert der Inhibitor Gal80 in allen wildtypischen Zellen die Expression des Gal4-aktivierten Markers und erst durch die Entfernung des Gal80 nach FRT-vermittelter mitotischer Rekombination ist dieser Marker in allen homozygoten Zellen nachweisbar (Abb. 3B).



**Abbildung 3: Generierung von MARCM Klonen im olfaktorischen System.** (A) Schematische Darstellung eines MARCM Klonen in den ORNs der Antenne. (B) Wirkungsweise des Gal4/Gal80 Systems. (C) Mitotische Rekombination in ORN Vorläufern sowie die daraus resultierenden Neurone.

## Flipout-Klone

Eine weitere Variante zur Mosaikanalyse Klone zu generieren, sind Flip-out-Klone. Konstrukte hierfür tragen ein zu exprimierendes Gen A, dessen ORF das von einer Kasette unterbrochen ist. Diese Kasette ist von FRT Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung flankiert. Gen A kann also nicht exprimiert werden, so lange die Kasette vorhanden ist. Bei Vorhandensein einer passenden Flippase wird die Kasette aus der DNA ausgeschnitten, und anschliessend wird Gen A exprimiert.

In der Kasette, die Gen A unterbricht, ist wiederum Gen B untergebracht. Gen B wird nur solange exprimiert, bis die Sequenz per Flippase entfernt wird (Struhl und Basler, 1994). Im Gegensatz zur mitotischen Rekombination erfordern Flip-out-Klone keine Zellproliferation.

## Flybow und Brainbow

Eine aktuelle Erweiterung des Repertoires zur Generierung von Klonen zur Mosaikanalyse sind die Systeme Brainbow und Flybow. Drosophila Brainbow ist eine Weiterentwicklung von Brainbow für Mäuse und nutzt Cre als Rekombinase. Die lox Erkennungssequenzen für die Cre

Rekombinase sind so angeordnet, dass in Anwesenheit von Cre stochastisch Transgene mit vier verschiedenen Fluorophoren/Proteinen exprimiert werden (Hampel et al, 2011).

Im Flybow-System werden stattdessen modifizierte FRT Erkennungssequenzen benutzt, die nur von einer darauf optimierten Flipase, genauer Flipase5, erkannt werden. Die Expression verschiedener Fluorophoren/Proteinen wird hier auch durch Flipase vermittelte Inversion von FRT sites mit gegenteiliger Orientierung erzielt (Hadjieconomou et al, 2011). Heute verwenden wir meist multi color flp out (MCFO) Experimente um Zellen in einem Gewebe unterschiedlich zu markieren. Hier wird ein Konstrukt verwendet, in dem die Expression von GFP mit unterschiedlichen Tags stochastisch über einen Flp induzierten Flp-out gesteuert wird. Da vier verschiedene GFP-Varianten unabhängig gesteuert werden können sind 15 verschiedene Farbkombinationen möglich.

### **GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP)**

Ähnlich wie beim split-Gal4, kann auch das GFP Protein in zwei Domänen zerlegt werden, die sich durch zusammenlagerung komplementieren und damit die GFP Fluoreszenz rekonstituieren. Die beiden Domänen heißen GFP<sup>1-10</sup> und GFP<sup>11</sup> und werden im Experiment über unterschiedliche Promotoren oder binäre Expressionssysteme exprimiert (Gal4 und LexA System). Mit Hilfe dieser Technik, können beispielsweise synaptische Kontakte oder allgemein Zell-Zell Kontakte bestimmt werden.

## Neurobiologie von *Drosophila*

### Neurogenese

Die Neurogenese beschreibt die (Mechanismen der) Entstehung des Nervensystems. Das Nervensystem komplexer Tiere besteht aus einem peripheren und einem zentralen Nervensystem (PNS, ZNS). Bei *Drosophila* besteht das ZNS aus einem segmental angelegten Bauchmark und dem „Gehirn“ (Ober- und Unterschlundganglion). Ein segmentierter Abschnitt des Bauchmarks wird als Neuomer bezeichnet (Unterschied zu Segment). Die verschiedenen „Teile“ des Nervensystems entstehen aus einzelnen Vorläuferzellen, die in dem Neuroektoderm spezifiziert werden und anschließend in das Körperinnere delaminieren.

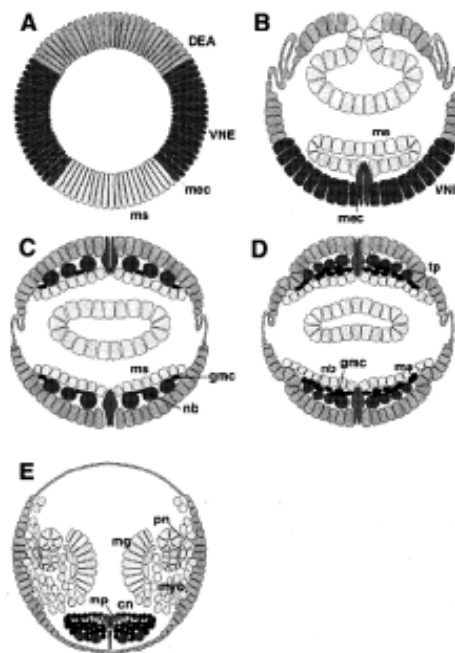


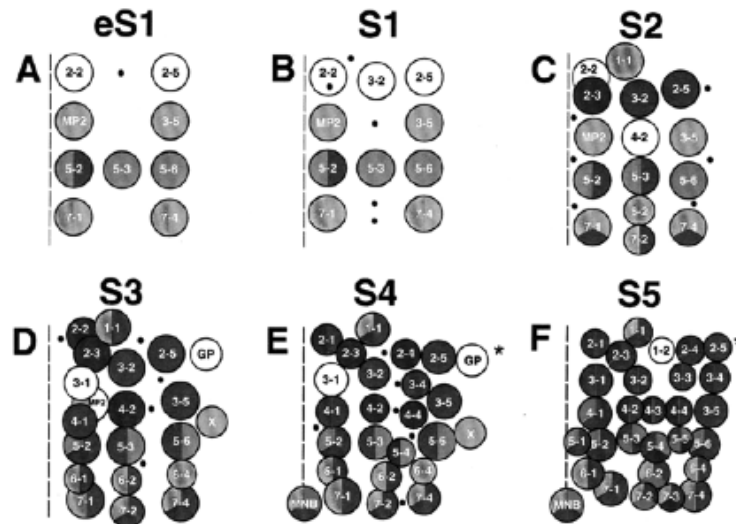
Abbildung 4: Querschnitte durch verschiedene Entwicklungsstadien.

A) Zelluläres Blastoderm, das prospektive ventrale Mesoderm (ms) ist von den lateralen neurogenen Regionen (VNE) durch die Zellen der späteren ZNS Mittellinie (mec) getrennt. Mit der Gastrulation stülpt sich das Mesoderm in das Innere des Tieres. Die Zellen der VNE werden größer. C) Nach der Gastrulation (Stadium 9) beginnen die Neuroblasten in das Innere des Tieres zu delaminieren. Während nur eine von 4 Zellen der VNE in das Innere des Embryos delaminiert, gehen alle Mittel-linienvorläuferzellen in das Innere des Embryos. D,E)

Nach der Streckung des Keimstreifes beginnen die Vorläuferzellen des Nervensystems, die Neuroblasten, ab Stadium 9 (3:40 - 4:20 h nach der Befruchtung) in 5 Wellen in das Innere des Embryos zu delaminieren. Dort nehmen sie ein stereotypes, stets wiedererkennbares Muster ein, das es erlaubt einzelne Neuroblasten gezielt anzusprechen (Abbildung 5). Anders als z.B. bei der Neurogenese von Vertebraten segregieren bei *Drosophila* i.R. einzelne neuronale Vorläuferzellen. (Ausnahme die Bildung des Gehirns). Die Neuroblasten teilen sich inäqual und bilden Gangliengliedermutterzellen, aus denen anschließend zwei neuronale / gliale Zellen hervorgehen. Im ausdifferenzierten zentralen Nervensystem befinden sich etwa 700 Neurone und 65 Gliazellen je Neuomer. Die einzelnen Neuroblasten werden in einer typischen Weise selektioniert. Zunächst führen Gene, die Positionsinformation vermitteln (z.B. Segmentierungsgene) zur Aktivierung von sogenannten proneuralen Genen. Bekannte proneurale Gene sind die Mitglieder des *achaete-scute*-Komplexes, *daughterless*, *atonal*. Die

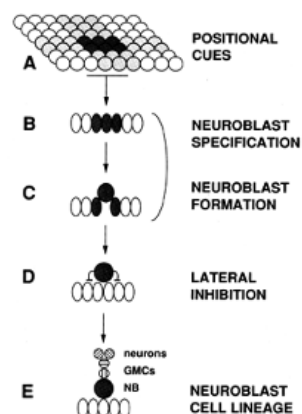
Funktion dieser Gene wird benötigt, um das neuronale Schicksal auszuprägen. Die proneuralen Gene kodieren alle *basic helix loop helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Um DNA zu binden und die Transkription nachgeschalteter Gene zu beeinflussen, müssen diese Proteine Homo- und Heterodimere bilden. Proneurale Gene, die bHLH Transkriptionsfaktoren kodieren, spielen auch in der Vertebraten-Neurogenese eine Rolle.

Die proneuralen Gene werden zunächst in größeren Zellgruppen exprimiert. Man spricht von einem "proneuralen Cluster". Alle Zellen eines solchen Clusters haben zunächst die gleiche Kompetenz das neuronale Entwicklungsschicksal einzuschlagen. Innerhalb eines Clusters muss in einem zweiten Schritt daher eine einzelne neuronale Vorläuferzelle, der Neuroblast oder auch



**Abbildung 5: Die Segregation der Neuroblasten verläuft in 5 Wellen (S1 bis S5).** Die einzelnen Neuroblasten sind an ihrer Position eindeutig zu erkennen. Einzelne Neuroblasten können leicht identifiziert werden (aus Doe et al, 1994).

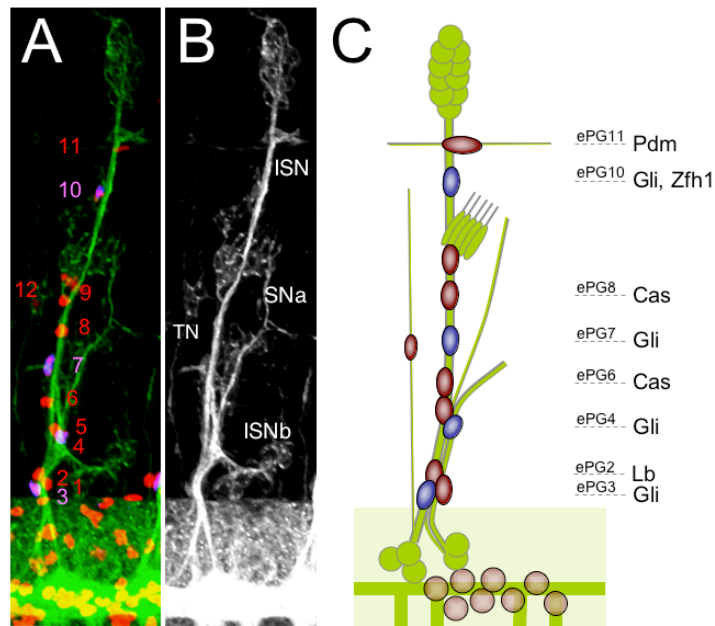
die SOP Zelle, ausgegliedert werden. Der hierzu notwendige Prozess wird als laterale Inhibition bezeichnet und genetisch von den sogenannten neurogenen Genen kontrolliert. Die neurogenen Gene werden für die Entwicklung der Epidermis benötigt. In ihrer Abwesenheit entstehen neurale Zellen auf Kosten der epidermalen Zellen.



**Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung der Entstehung neuraler Zellen**

Sobald eine einzelne Vorläuferzelle determiniert ist, muß sie ihre Identität erfahren, man spricht von Spezifizierung. Anschließend teilt sich der Neuroblast inäqual und bildet eine

Gangliengliumutterzelle. Die Gene, die die inäquale Zellteilung kontrollieren, sind im Wesentlichen bekannt (*inscuteable*, *bazooka*, *Pins Gai*, *Par6*, *PTEN*, *numb*, *prospero*, *miranda*, *pon*, *lgl*, *zip*). Ein Neuroblast kann sich bis zu 12x teilen. Die entstehenden Gangliengliumutterzellen erfahren über eine molekulare Uhr ihr Entwicklungsalter. Die genauen Zellstammbäume der einzelnen CNS Neuroblasten sind inzwischen aufgeklärt (-> Einzelzellmarkierungen). Es gibt strikt neuronale, strikt gliale und gemischte neuronale-gliale Zellstammbäume. Neben den etwa 700 neuronalen Zellen, gibt es etwa 65 gliale Zellen je Neuomer. Das Verhältniss glialer Zellen zu neuronalen Zellen ist daher in etwa reziprok zu dem Verhältniss beim Menschen (*Drosophila*: 10% der Zellen glial; Mensch: etwa 10% der Zellen neuronal).



**Abbildung 7:** Verteilung einiger wichtiger Gliazellen im Stadium 15 Nervensystem. Es gibt 12 periphere Gliazellen und ca. 30 zentrale Gliazellen in jedem Hemisegment. Dazu kommen 3-4 Mittelliniengliazellen. Einige Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung peripherer Glia steuern sind angegeben.

Die Neurone differenzieren und senden Axone aus. Die Spitze eines Axons, der Wachstumskegel nimmt während des Auswachsens in der Umgebung Signale auf, die schließlich eine korrekte Wegfindung und damit eine korrekte Verschaltung ermöglichen. Das axonale Muster im *Drosophila* ZNS erinnert an eine Strickleiter (Strickleiternnervensystem). Die Sprossen sind die Kommissuren. Sie verbinden die beiden kontralateralen Hälften des Nervensystems. Die einzelnen Neuomere sind über longitudinale Konnektive verknüpft. Das *Drosophila* Nervensystem ist bilateral symmetrisch angelegt. Die lateralen ZNS Regionen werden durch spezielle Zellen entlang der Mittellinie verbunden. Diese Mittellinienzellen haben eine charakteristische Morphologie und üben eine Reihe von evolutionär konservierten Funktionen aus. Neben der Beeinflussung der Differenzierung lateraler Neurone steuern die Mittellinienzellen das Auswachsen kommissuraler Axone. Die wachsende Spitze eines Neurons, der Wachstumskegel, perzipiert ein attraktives Signal, wie es z.B. durch die von den Mittellinienzellen produzierten Netrin Proteine vermittelt wird. Das zugrunde liegende Signalsystem ist evolutionär konserviert.

Die Vorläuferzellen der Mittellinie sind die ersten ZNS Zellen, die spezifiziert werden (das gleiche gilt auch für die Mittellinienzellen des Neuralrohrs der Vertebraten, den Bodenplattenzellen oder *floor plate cells*). In *Drosophila* kann man eine Spezifikation der Mittellinienzellen bereits im Blastodermstadium nachweisen. Zwei Zellreihen, die durch die

Expression des Gens *single minded* charakterisiert sind, flankieren die Anlage des Mesoderms und werden nach der Gastrulation an der geometrischen Mittellinie zusammengebracht. Aus 6-8 Mittellinien-Vorläuferzellen je Segment bilden sich etwa 26 Mittellinienzellen (3-4 Mittelliniengliazellen, 6 VUM Neurone, MP1 Neurone sowie der mediane Neuroblast mit seinen Begleitzellen).

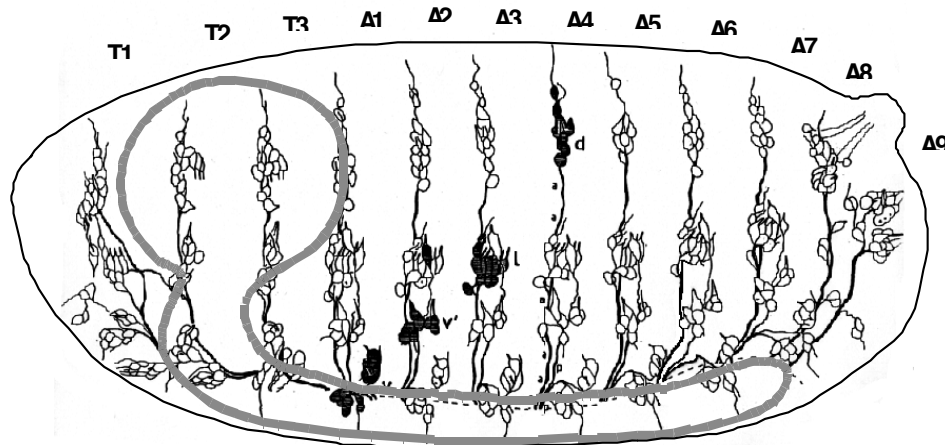
## **CNS Axonmusterentwicklung**

Die Entwicklung des ZNS-Axonmusters (Strickleiternnervensystem) beginnt im frühen Stadium 12. Zunächst wird die posteriore Kommissur angelegt, dann die anteriore Kommissur in direkter Nachbarschaft. Die beiden Kommissuren werden durch eine Einwanderung der Mittelliniengliazellen in ihre endgültige "Sprossenform" gebracht. Erst anschließend entstehen die longitudinalen Konnektive, die die einzelnen Neuomere mit einander verbinden.

Das erste Auswachsen kommissuraler Wachstum auf die Zellen der ZNS Mittellinie hin wird in *C. elegans*, der Maus, dem Huhn und in *Drosophila* von den Netrinen kontrolliert. Diese evolutionär konservierten Proteine werden von den Mittellinienzellen sezerniert und bilden wahrscheinlich einen Gradienten in der extrazellulären Matrix aus. Die kommissuralen Wachstumskegel können diesen Gradienten mit Hilfe des Frazzled Rezeptors (in Vertebraten Dcc, in *C. elegans* Unc40) erkennen. Die Aktivierung des Frazzled Rezeptors ermöglicht ein Kreuzen der Mittellinie. In einem weiteren Schritt muß dem Wachstumskegeln „verboten“ werden, die zunächst attraktiv wirkende Mittellinie ein weiteres Mal zu überqueren. Hierzu werden zur Zeit zwei Mechanismen diskutiert. Zum einen weiß man, dass die intrazelluläre cAMP Konzentration die Wirkung der Frazzled Aktivierung von attraktiv zu repulsiv umsteuern kann. Neben seiner attraktiven Wirkung kann das Netrin Signal über einen repulsiv wirkenden Rezeptor (unc 5) ein Wegwachsen von der Netrinquelle ermöglichen.

Weiterhin ist das repulsiv wirkende Slit Signal bekannt, das ebenfalls von den Mittellinienzellen sezerniert wird. Slit wird vom Transmembranrezeptor Roundabout erkannt. In Anwesenheit von Slit können Roundabout exprimierende Wachstumskegel die Mittellinie nicht mehr kreuzen. Auch das Slit Protein und sein Rezeptor sind während der Evolution konserviert worden.

## Das periphere Nervensystem



**Abbildung 9: Das periphere Nervensystem von *Drosophila melanogaster*.** Erläuterung siehe Text.

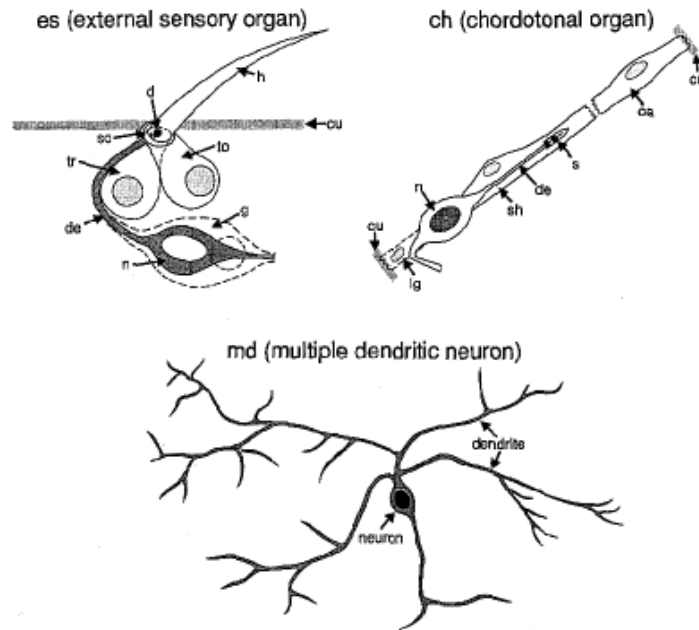
Das periphere Nervensystem (PNS) von *Drosophila* hat sensorische und motorische Anteile: Sensorische Nerven leiten die in besonderen Sinnesorganen empfangenen Meldungen in das zentrale Nervensystem, motorische Nerven leiten motorische Impulse aus dem ZNS in die Muskulatur. Im PNS gibt es verschiedene Typen von Sinnesorganen. Neben den lichtempfindlichen Photorezeptorzellen (larvales Auge = Bolwig Organ, in der Imago Komplexauge) gibt es drei Haupttypen von Sinnesorganen:

- 1) Solche mit äußeren, epidermalen Spezialisierungen (ES-Organe), die Meldungen aus der Umwelt empfangen (Mechano-, Chemo-, Thermo-, Hygrorezeptoren, etc. Zum Beispiel Borsten).
- 2) die inneren (oder Chordotonal-) Organe (Ch-Organe), die zwischen Muskeln oder zwischen Muskel und Epidermis angeordnet sind und als Spannungsmesser funktionieren.
- 3) Multidendritische Sinnesorgane mit unbekannter Funktion.

Im Embryo und in der Larve werden die verschiedenen Sinneszellen nach ihrer Position eingeteilt. Man unterscheidet: Dorsale Gruppe, laterale Gruppe, ventrolaterale Gruppe und die ventrale Gruppe.

Es gibt segmentale ausgeprägte Unterschiede. In den Segmenten T1-T3 zeigen die lateralen Chordotonalorgane nach ventral und sind auf Höhe der dorsalen ES-Organe positioniert, während sie in den Abdominalen Segmenten A1-A8 lateral positioniert sind und nach dorsal zeigen.

Die einzelnen Vorläuferzellen und ihre Zellstammbäume sind bekannt. Es- und Ch-Organe bestehen aus einer oder, bei Chemorezeptoren, mehreren Sinneszellen, sowie aus drei oder mehr Nebenzellen, die die verschiedenen Teile der Sinnesorgane bilden. Die Sinnesorgane sind in einem präzisen Muster angeordnet, das erlaubt, die verschiedenen Sinnesorgane eindeutig zu identifizieren.



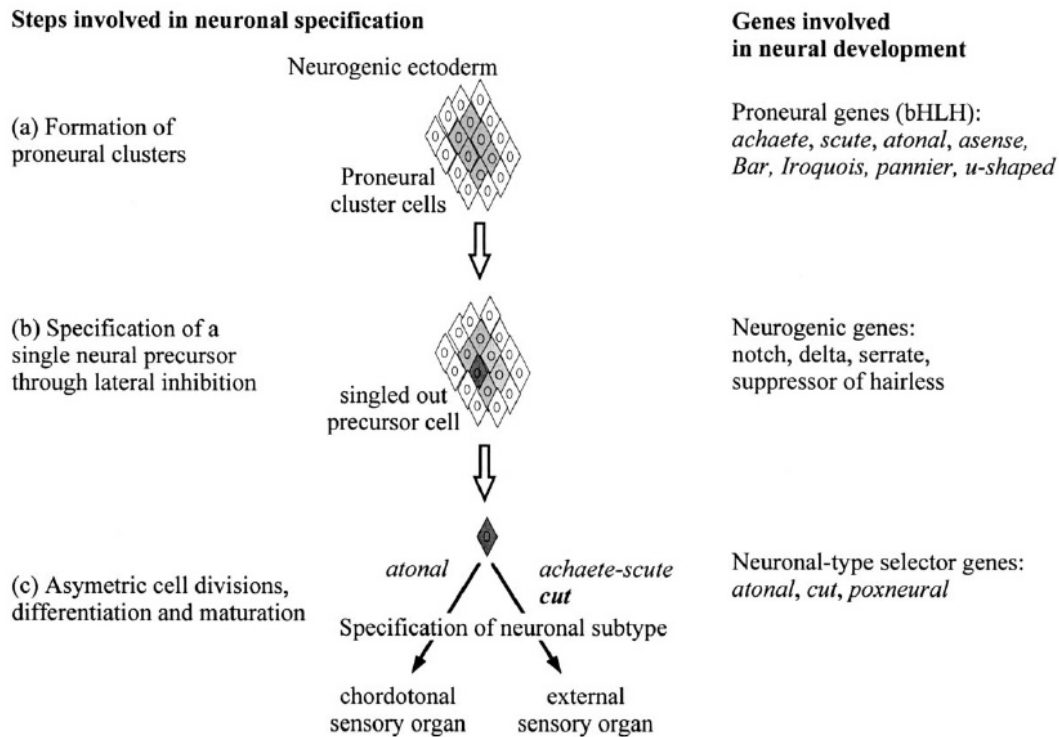
**Abbildung 10: Schemata für Sinnesorgane (es), Chordotonalorgan (ch) und multidendritisches Neuron.** Erläuterung siehe Text.

Die Zellen eines Sinnesorgans bilden einen Zellklon: jedes entwickelt sich aus einer besonderen, in der Epidermis entstandenen Vorläuferzelle (SOP, sensory organ precursor cell). Diese Zellen teilen sich nach einem stereotypen Muster und bringen die verschiedenen Bestandteile der Sinnesorgane hervor. Die Entwicklung der Sinnesorgane steht unter der Kontrolle von vielen Genen. Die neuronalen Vorläuferzellen werden zur Bildung von Sinnesorganen durch die Aktivität der proneuralen Gene befähigt.

Die Entwicklung der Es Organe wird durch die proneuralen Gene, die sich in dem *achaete-scute*-Genkomplex (AS-C) befinden, gesteuert. Der AS-C enthält die Gene *achaete*, *scute*, *lethal of scute* und *asense*. Sie kodieren für DNA-bindende, regulatorische Proteine der Familie der bHLH-Proteine. Das heißt, das Aktivitätsmuster der AS-C Gene ist dafür verantwortlich, daß bestimmte epidermale Zellen als Vorläuferzellen von ES-Organen festgelegt werden. Dementsprechend können Embryonen ohne AS-C keine ES bilden, jedoch entwickeln sich alle ChO in AS-C mutanten Embryonen normal. Im adulten Tier führt der Verlust von *achaete* oder *scute* zum Verlust bestimmter Borsten auf Kopf und Thorax. Das Gen *lethal of scute* ist für die Entwicklung des zentralen Nervensystems erforderlich, aber entbehrlich für die Entwicklung des peripheren Nervensystems. Das proneurale Gen für die Entwicklung der Ch-Organen ist *atonal*, das ebenfalls ein bHLH Protein kodiert.

Ein weiteres, für die Entwicklung aller Sinnesorgane notwendiges Gen ist *daughterless*, das ebenfalls ein bHLH Protein kodiert. *daughterless* mutante Embryonen haben keine Sinnesorgane; dieser Defekt ist auf die Unfähigkeit der epidermalen Zellen, die neurale Entwicklungsbahn einzuschlagen, zurückzuführen. Außer der Determination der Vorläuferzellen der ES steht auch die Identität der zwei Haupttypen von Sinnesorganen unter genetischer Kontrolle. Zum Beispiel ist die Aktivität des Gens *cut* Voraussetzung für die Spezifizierung der Vorläuferzellen der ES. *cut*-Embryonen haben keine ES, da diese in ChO transformiert worden sind.

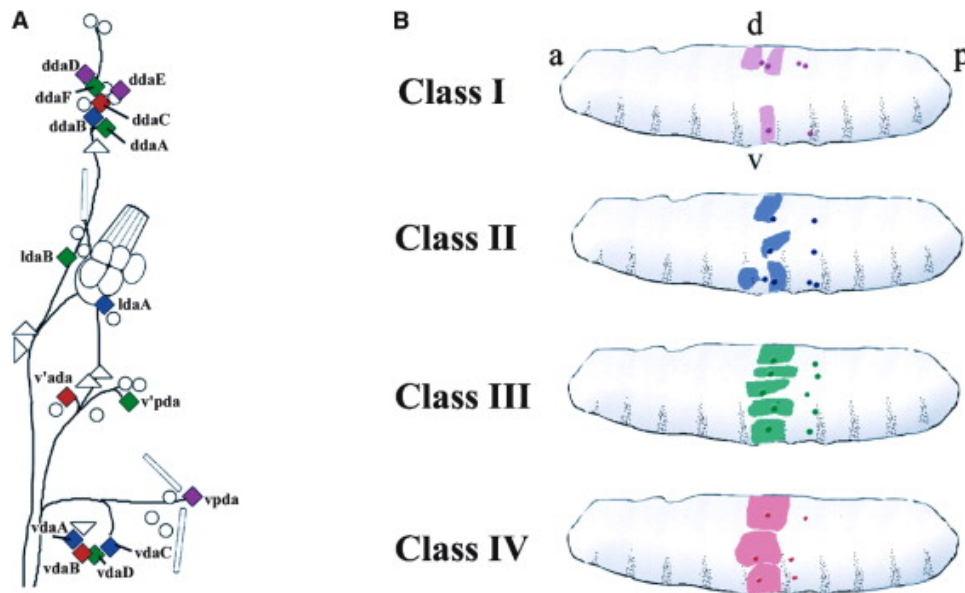




**Abbildung 11: Die Entwicklung sensorischer Organe in *Drosophila*.** Erläuterung siehe Text. Aus Nepveu, 2001

### Dendritenmorphogenese und regulierte Neurodegeneration im larvalen PNS

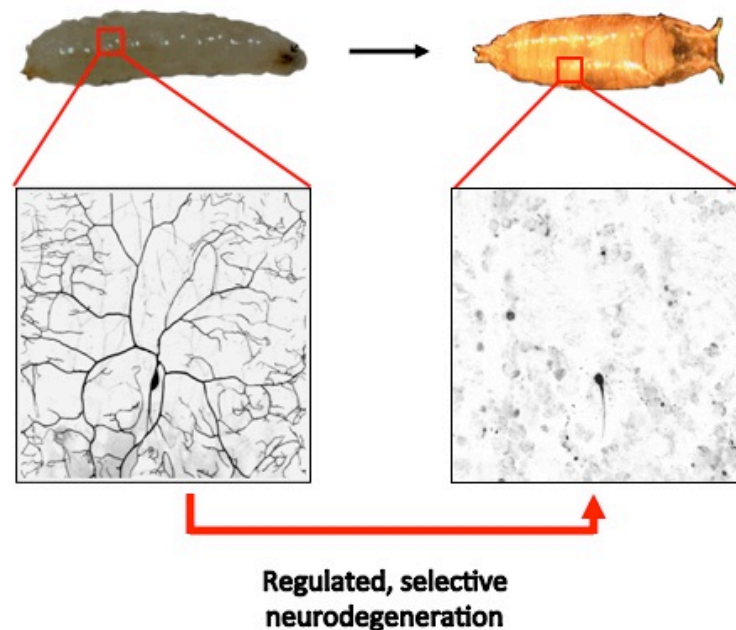
Die „dendritic arborization“ (da)-Neurone konstituieren einen Subtyp von Neuronen des peripheren Nervensystems von *Drosophila*-Larven. Die da-Neuronen sind sensorische Nervenzellen, die in der larvalen Epidermis lokalisiert sind und mit ihren langen, verästelten Dendriten sensorische Stimuli wahrnehmen. Es gibt vier Klassen von da-Neuronen (I – IV), die sich in ihrer Dendritenmorphologie unterscheiden (Abb. 11a) (Grueber, 2002), diese morphologischen Unterschiede reflektieren die unterschiedlichen Funktionen der jeweiligen Unterklasse, v. a. hinsichtlich der wahrgenommenen Stimuli (Class I: mechanosensitiv, Regulation von Peristaltik und Fortbewegung, Class III: feine mechanische Stimuli („light touch“), Class IV: UV-Licht, starke mechanische Stimuli (Schmerzrezeptoren) (Hwang 2007, Cheng, 2010, Xiang 2011, Yan 2012). Wegen ihrer Lage direkt unter der Haut kann man da-Neuronen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie sehr gut hochauflösend darstellen, und sie sind ein häufig verwendetes Modell zur Untersuchung der Morphogenese von Dendriten.



**Abbildung 11a: Lage und dendritische Felder von da-Neuronen verschiedener Klassen (aus Grueber, 2003).**

Die sogenannten C4 (für „class IV“-) Neurone sind durch besonders lange und verästelte Dendriten gekennzeichnet, mit denen die gesamte Haut der Larve abgedeckt wird. Diese Dendriten weisen das „Tiling“-Phänomen auf, d. h., die Dendriten desselben Neurons - und auch die Dendriten desselben neuronalen Subtyps- überlappen sich nicht. Man sagt auch, dass die Dendriten von C4-Neuronen die Epidermis komplett, aber „nicht-redundant“ abdecken (Grueber 2003).

In der Puppenphase (Metamorphose) wird das Nervensystem der Larve stark remodelliert und den Bedürfnissen der adulten Fliege angepasst. Dabei werden viele neue Nervenzellen produziert, und viele larval-spezifische Neurone werden durch Apoptose entfernt. Die C4-Neuronen überleben die Puppenphase, werden aber ebenfalls remodelliert, indem ihre larvalen Dendriten spezifisch absterben bzw. degenerieren (Abb. 11b) (Kuo 2005, Williams 2005). Diese Art von regulierter Neurodegeneration wird auch als „Pruning“ bezeichnet (Englisch: to prune, stutzen, zurückschneiden).








**Abbildung 11b:** Larvale Dendriten von C4-Neuronen degenerieren während der Metamorphose. Das larvale C4-Neuron (links) hat lange, verästelte Dendriten, die am Anfang der Metamorphose degenerieren. Das Bild rechts zeigt ein C4-Neuron etwa einen Tag nach der Verpuppung (18 hours after puparium formation, h APF).

### Referenzen

- Grueber, WB, Jan LY, Jan, YN (2002) *Development* **129**: 2867-78.  
 Grueber, WB, Ye, B, Moore, AW, Jan LY, Jan YN (2003) *Curr Biol* **13**: 618-26.  
 Hwang RY, Zhong L, Xu Y, Johnson T, Zhang F, Deisseroth K, Tracey WD (2007) *Curr Biol* **17**: 2105-16.  
 Cheng LE, Song W, Looger LL, Jan LY, Jan YN (2010) *Neuron* **67**: 373-80  
 Xiang Y, Yuan Q, Vogt N, Looger LL, Jan LY, Jan YN (2010) *Nature* **468**: 921-6  
 Yan Z, Zhang W, He Y, Gorczyca D, Xiang Y, Cheng LE, Meltzer S, Jan LY, Jan YN (2013) *Nature* **493**: 221-5  
 Kuo CT, Jan LY, Jan YN (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 15230-5  
 Williams DW, Truman JW (2005) *Development* **132**: 3631-42.

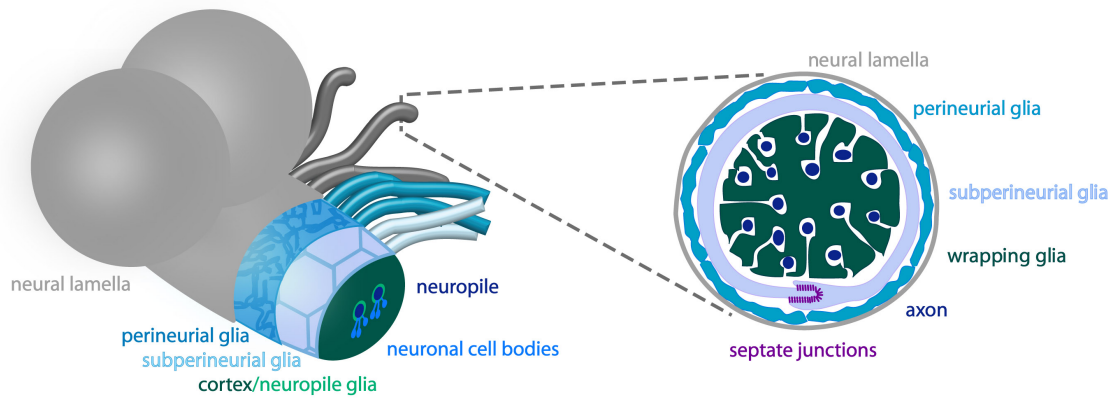
## Entwicklung glialer Zellen

Das Nervensystem verfügt über eine sehr kleine Zahl von Gliazellen, die jeweils über sehr ähnliche molekulare Mechanismen spezifiziert werden. Bis auf die Mittelliniengliazellen, werden alle Gliazellen durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors Glial cells missing (Gcm) spezifiziert und in *gcm* Mutanten sind gliale Zellen in neuronale Zelltypen transformiert. Gcm

Development ↓	Stage	Process	Lateral glia	Midline glia
		Cell fate	<i>glial cells missing1,2</i>	<i>single-minded, tango</i> <i>EGF-R-signaling</i>
		Cell division	<i>tramtrack,</i> <i>prospero,</i> <i>anachronism</i>	<i>EGF-R signaling,</i> <i>Ecdyson-receptor -</i> <i>signaling</i>
		Early differentiation, Cell migration	<i>repo, pointed, tramtrack,</i> <i>robo, slit, heartless, non-</i> <i>stop, fear of intimacy</i>	<i>fear of intimacy</i>
		Wrapping	<i>dead ringer, loco,</i> <i>gliotactin, axotactin,</i> <i>neurexin IV, fray</i>	<i>wrapper</i>
		Pruning, Homeostasis	<i>draper, glutamate trans-</i> <i>porter</i>	<i>glutamate trans-</i> <i>porter</i>

**Abbildung 12: Gliogenese in *Drosophila*.** Erläuterung siehe Text

aktiviert ein Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die die gliale Differenzierung umsetzen (Repo: Homeodomänen-TF; Pointed: ETS-Domänen-TF; Prospero; Distalless; Deadringer). Gleichzeitig induziert Gcm die Expression des BTB/POZ Zn-Finger-TFs Tramtrack, der neuronale Entwicklung in nicht neuronalen Zellen (Glia und Tracheensystem) repimiert. Im Gegensatz zu Gcm ist die Tramtrack Funktion während der Evolution konserviert worden (REST).



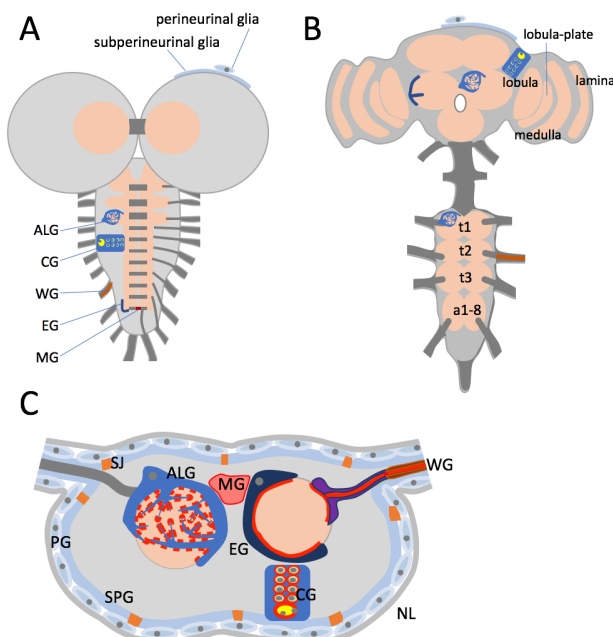
**Abbildung 13: Organisation glialer Schichten im Nervensystem von *Drosophila*.**  
Erläuterung siehe Text.

Die glialen Zellen des Nervensystems lassen sich in wenige Zelltypen klassifizieren. Die perineurialen Gliazellen umgeben das PNS und das ZNS. Sie stehen nicht direkt mit Nervenzellen in Verbindung und stellen die einzige teilungsaktive gliale Zellpopulation dar. Ihre Funktion ist unbekannt.

Die subperineurialen Gliazellen stellen die nächste gliale Schicht dar. Sie sind sehr groß und sehr flach und mittels *Septate junctions* miteinander verbunden. Im PNS können die subperineurialen Gliazellen Kontakt mit Axonen haben. Sie werden am Ende der Embryonalentwicklung geboren und teilen sich nicht mehr. Die subperineurialen Gliazellen bilden die wesentliche Komponente der Blut-Hirn-Schranke.

Axone werden von verschiedenen umhüllenden Gliazellen umwachsen. Entlang eines peripheren Nervens liegen nur wenige (3-4) dieser Gliazellen die zunächst ganze Axonbündel und gegen Ende der Larvalentwicklung einzelne Axone einzeln umhüllen. Im ZNS lassen sich weitere gliale Zelltypen finden, die zum einen umhüllende Funktion haben (z.B. die longitudinale Glia). Weiterhin finden sich im ZNS Astrozyten-ähnliche Gliazellen, die unter anderem die Aktivität der zentralen Synapsen modulieren.

Daneben finden sich im ZNS noch sogenannte Kortexgliazellen, die intensive Kontakte mit neuronalen Zellkörpern ausbilden und möglicherweise bei der Kompartimentierung des Nervensystems von Bedeutung sind.



**Abbildung 14: Organisation glialer Schichten im Nervensystem von *Drosophila*.** A) Larvales Gehirn. B) Adultes Gehirn. C) Querschnitt durch das Bauchmark mit einmündende Nerven. PG perineuriale Glia, SPG subperineuriale Glia, ALG astrocyte-like cells, CG cortex glia, WG wrapping glia (PNS specific), EG ensheathing glia, MG midline glia, t1-3 thoracic neuromeres 1-3, a1-8 abdominal neuromeres 1-8. NL neural lamella.

## Migration glialer Zellen im Nervensystem

Während der Entwicklung des Nervensystems verlassen Gliazellen meist den Ort ihrer Entstehung und migrieren zu ihrem Zielort. Oft ist die Migration essentiell für die Normalentwicklung. Ist beispielsweise die Migration der Mittellinienglia gestört, erscheinen die Kommissuren fusioniert. In einem genetischen Ansatz wurden ca. 20 Gene isoliert, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen. Diese Gruppe beinhaltet unter anderem Mutanten im Gen *kette* die zu einem Projektionsdefekt der VUM Neurone führen, welcher mit ausbleibender Migration der Mittellinienglia korreliert. Das Kette Protein hat eine Funktion bei der Regulation der Aktivität des Arp2/3 Komplex, welcher die Dynamik des F-Aktin Zytoskeletts reguliert und im Kurs noch näher besprochen wird.

Die longitudinalen Gliazellen sind Nachkommen eines Glioblasten, welcher vom lateralen Rand des ventralen Neuroektoderms delaminiert. Die longitudinalen Gliazellen migrieren zunächst nach medial und anschließend in anterior-posteriorer Richtung entlang der sich bildenden Konnektive, welche sie später umhüllen. Ablationsstudien und die Analyse von Mutanten, in denen die Bildung longitudinaler Glia gestört ist, konnten zeigen, dass die longitudinale Glia benötigt wird, um Pionieraxonen frühe Richtungsinformationen zu vermitteln und die Faszikulation der Axone zu regulieren.

Die peripheren Gliazellen des embryonalen Nervensystems migrieren über die weiteste Distanz. Das periphere Nervensystem (PNS) besteht pro Hemisegment aus zwei Hauptaxontrakten - dem intersegmentalen Nerv (ISN) und dem segmentalen Nerv (SN). Diese setzen sich sowohl aus sensorischen als auch aus motorischen Fasern zusammen, die in getrennten Faszikeln zusammengefasst sind. Die meisten der 12 peripheren Gliazellen in einem Hemisegment entstehen im ZNS aus den Neuroblasten 1-3 und 2-5. Diese Gliazellen verlassen das ZNS im Stadium 13 und migrieren über unterschiedlich weite Distanzen entlang der Motoraxone. Drei periphere Gliazellen entstehen im peripheren Nervensystem. Die Migration endet etwa im Stadium 16. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine charakteristische Verteilung der insgesamt 12 Gliatzellkerne entlang des ISN und SN. Die Visualisierung des F-Aktin Zytoskeletts zeigt, dass Gliazellen, welche direkt hinter den axonalen Wachstumskegeln migrieren, filopodienähnliche Ausstülpungen haben. Die nachfolgenden Zellen wirken weniger dynamisch. Nach der Migrationsphase beginnt die Differenzierung der Gliazellen und die Umhüllung der Nerven.

In *Drosophila* ist das Komplexauge Bestandteil des peripheren Nervensystems. Das Komplexauge entsteht während der larvalen und pupalen Entwicklung aus der Augenimaginalscheibe über die im Laufe des dritten Larvalstadiums von posterior nach anterior eine Differenzierungswelle läuft, welche vorne durch die sogenannte morphogenetische Furche gekennzeichnet ist. Posterior der morphogenetischen Furche, findet die sequentielle Differenzierung der Photorezeptorzellen statt, welche dazu führt, dass Cluster aus acht Photorezeptorzellen R1 - R8 in sehr regelmäßiger Anordnung auf der Augenimaginalscheibe verteilt sind. Jede dieser Zellen entsendet ein Axon, welches zunächst nach basal auswächst und dann nach posterior dreht, um in den optischen Stiel zu projizieren. Der optische Stiel stellt die Verbindung zwischen Augenimaginalscheibe und dem optischen Lobus dar. Während die Axone der sich differenzierenden Photorezeptorzellen nach posterior projizieren, wandern in entgegengesetzter Richtung – also aus dem optischen Stiel nach anterior – Gliazellen in die Scheibe ein. Diese Glia werden auch als Retinobasalgia bezeichnet und befinden sich niemals anterior der morphogenetischen Furche. Anders als die peripheren Gliazellen der segmentalen Nerven des Embryos benötigen die Retinobasalgiazellen allerdings kein axonales Substrat, um in die

Augenimaginalscheibe zu migrieren. Sie migrieren entlang einer großen Gliazelle, der Carpet Zellen, die sich über das gesamte Augenfeld erstreckt.

Das Migrationsverhalten von Gliazellen, die aus dem ZNS während der Metamorphose in andere periphere Körperanhänge bzw. Organe wie z.B. die Beine migrieren, ist bislang nicht so gut untersucht.

## Rolle der Blut-Hirn-Schranke (BHS) im Zuckerstoffwechsel

Um das Gehirn mit Energie zu versorgen, muss Zucker aus der Hämolymphe über die BHS ins Gehirn transportiert werden. Da der parazelluläre Transportweg durch die von den Subperineurialglia gebildeten *septate junctions* blockiert ist, müssen die Zuckermoleküle mithilfe von Transportproteinen in die Gliazellen aufgenommen und in die extrazelluläre Flüssigkeit im Gehirn abgegeben werden. Es ist anzunehmen, dass dieser Transport von neuronalen Signalen reguliert wird, um den Energieverbrauch der Neurone zu decken und gleichzeitig ein osmotisches Ungleichgewicht zu vermeiden. Abhängig von ihrem metabolischen Status könnten Neurone also die Expression oder Aktivität von Zuckertransportern in den sie umgebenden Gliazellen regulieren. Die genaue Funktionsweise dieses Systems wird zur Zeit intensiv untersucht.

## Entwicklung des neuromuskulären Systems in Drosophila

Die erste neuronalen Vorläuferzelle, die Motoneurone ausbildet ist der Neuroblast 1-1. Eine seiner Ganglienmutterzelle teilt sich äqual in die Neurone aCC (anterior corner cell) und pCC (posterior corner cell). Sobald die Neurone geboren sind, beginnen sie mit der weiteren Differenzierung. aCC entwickelt sich in ein Motoneuron und pCC in ein Interneuron. Beides sind Pioneerneurone, d.h. die Wachstumskegel ihrer Axone bahnen den Weg für den Verlauf späterer Nerven, da sie den Weg zum jeweiligen Zielgebiet finden müssen. Das aCC Neuron etabliert den ISN Nerv. Während des axonalen Wachstums sondiert der Wachstumskegel die Umgebung nach Informationen, die wichtig für seine Richtungsentscheidungen sind. Dabei spielen sowohl weit reichende, diffundierende Moleküle, wie z. B. Netrine oder Beaten path eine Rolle, aber auch stationäre Moleküle, die auf Zelloberflächen oder in der extrazellulären Matrix angebracht sind, wie z.B. Sidestep oder Dlar. Sowohl diffundierende wie stationäre Signale können anziehend oder abweisend für Wachstumskegel sein, geleiten aber in ihrer Summe den Wachstumskegel zum Zielgewebe, in unserem Fall das Muskelgewebe. Sobald ein Wachstumskegel im Zielgebiet angekommen ist, erkundet er die Oberfläche der Muskelfasern und selektiert einen bestimmten Zielmuskel. Tendenziell wächst der Wachstumskegel zuerst zu seiner maximalen Ausdehnung und seinem endgültigen Zielort bevor sich Seitenverzweigungen und synaptische Endknöpfchen bilden. Der ISN ist einer von insgesamt 6 peripheren Nervensträngen (ISN, ISNb, ISNd, SNa, SNc, TN), die Muskeln innervieren (Abb. 10). Der ISN, SNa und SNc enthalten zusätzlich noch afferente Nervenbahnen, die sensorische Information ans zentrale Gehirn leiten. Sensorische und motorische Nerven liegen also teilweise gebündelt vor und werden von einer gemeinsamen Gliazellschicht umhüllt.



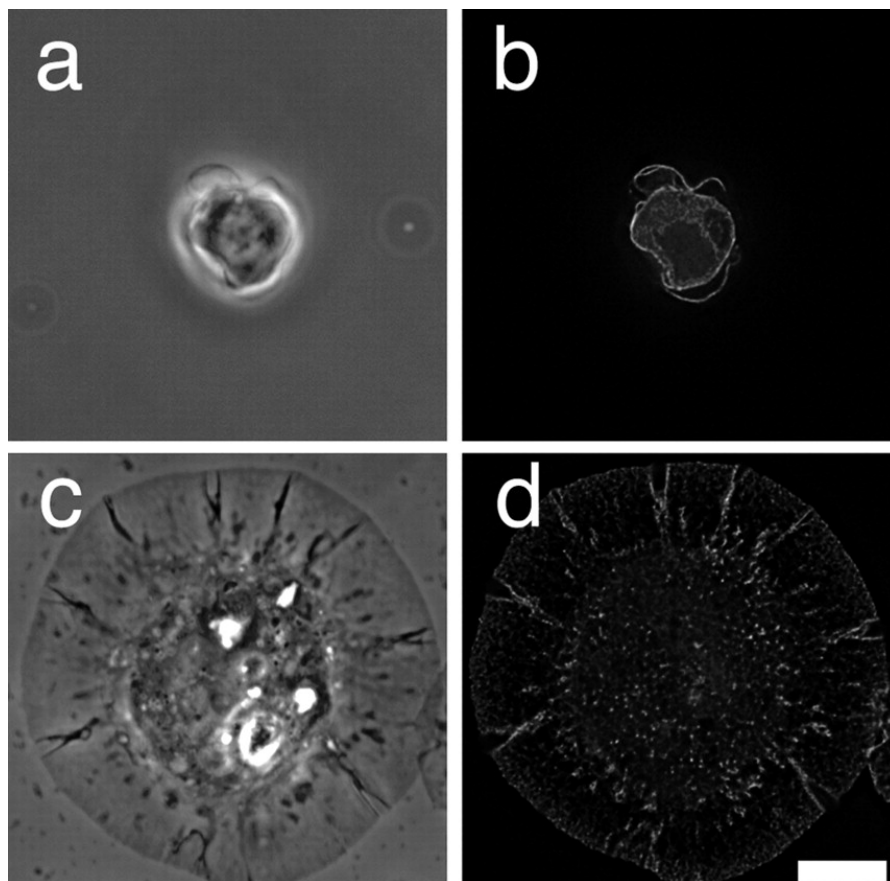
**Abbildung 15: Etablierung des Intersegmentalnervs.** Erläuterung siehe Text



## ***Zellkultur in Drosophila***

### **Schneider (S2) Zellen – ein einfaches Zellkulturmodell zur Analyse zelluläre Prozesse in Drosophila**

Die Fruchtfliege *Drosophila* ist sicherlich der Superstar unter den Modellorganismen der Lebenswissenschaften. Grundlegende Erkenntnisse der Genetik und Entwicklungsbiologie wurden an ihr gewonnen. Trotz der enormen Vorteile von *Drosophila* fehlte lange Zeit ein reduktionistisches Zellkulturmodell mit deren Hilfe grundlegende zelluläre Prozesse einfach und effizient auch in *Drosophila* untersucht werden konnten. Schneiders *Drosophila* Line 2 (S2) Zellen sind in den letzten Jahren ein populäres und wichtiges Modellsystem für zellbiologische und funktionelle Genomstudien geworden. S2 Zellen sind Makrophagen ähnliche Zellen, die aus 20-24 Stunden alten Embryonen isoliert wurden. Im Gegensatz zu Säugerzellen benötigen S2-Zellen keine geregelte Atmosphäre, sondern können in einer Vielzahl von Medien bei Raumtemperatur einfach kultiviert werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Insektenzellen besteht darin, dass die Methodik der RNAi durch Inkubation der Zellen mit langen doppelsträngigen RNA (dsRNA)-Molekülen relativ einfach und kostengünstig ist. Zahlreiche kürzlich durchgeführte genomweite RNAi-Screens mit S2 Zellen haben zur Identifizierung zentraler Regulatoren der Aktin-Dynamik, der Zellteilung, des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus und diverser Signalwege geführt.



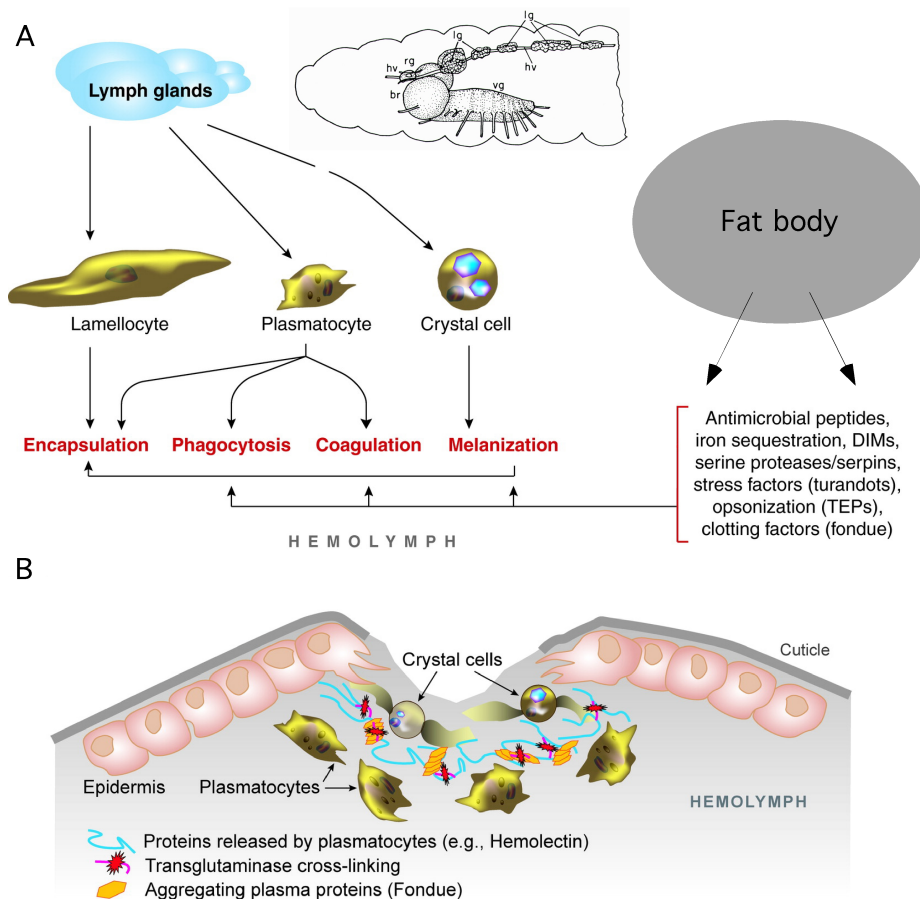
**Abbildung 22: Spreitung von *Drosophila* S2 Zellen auf ConA** (aus: Rogers et al., 2003). S2 Zellen, die EGFP-Aktin exprimieren, plattiert auf Polylysin (a, b) oder auf ConA (c, d), aufgenommen mit Phasenkontrast- (a, c) oder Fluoreszenz-Mikroskopie. Maßstab: 10  $\mu$ m).

Unter normalen Zellkulturbedingungen weisen S2 Zellen eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$  auf (Abb. 22). Die Zellen sind nicht motil und weisen morphologisch keine offensichtliche Zellpolarität auf. Im Gegensatz zu S2 Zellen sind nachfolgend isolierte S2 Sub-Zelllinien wie S2R+ adhärent. Beide, S2 und S2R+ Zellen zeigen dramatische morphologische Veränderungen wenn sie auf Concanavalin A (ConA) beschichtete Oberflächen ausplattiert werden. Innerhalb von 20-30 min nach dem Aussäen spreiten sich die Zellen auf ConA aus, werden extrem flach und nehmen eine discoidale („Spiegelei-ähnliche“) Zellform an. Die enorme Vergrößerung der Zelloberfläche, induziert durch ConA, ermöglicht eine sehr hohe subzelluläre Auflösung, so dass distinkte Zellkompartimente und Organellen dieser Zellen analysiert werden können. Zelltransfektionen und Expression von Reportern wie EGFP- oder Cherry-Fusionen ermöglichen zudem die Visualisierung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen. Zur genauen Darstellung der Morphologie und Dynamik der S2 Zellen stehen heute hochauflösende Mikroskopie-Technologien wie die *Structured Illumination* und die *Spinning Disc* Mikroskopie zur Verfügung (siehe unten).

### **Primäre Hämozyten – ein ex vivo und in vivo Modellsystem zur Analyse von Einzelzellmigration**

Insekten wie *Drosophila* besitzen ein offenes Blutkreislaufsystem, d.h. Hämolymphe fließt in allen Entwicklungsstadien frei durch den extrazellulären Raum – das Hämocöl. Das Hämocöl enthält sowohl zirkulierende als auch sessile am Integument festsitzend Hämozyten (Häm = gr.: Blut; Zyto = gr.: Zelle). *Drosophila* Larven besitzen mehrere tausend Hämozyten, die aufgrund ihrer morphologischen und funktionellen Besonderheiten in drei Zelltypen unterteilt werden. Plasmatozyten repräsentieren 90-95% aller reifen larvalen Hämozyten und sind maßgeblich an der zellulären Immunabwehr beteiligt. Sie phagozytieren und verdauen Bakterien und Pilze, aber auch tote Zellen; daher werden sie oft als Makrophagen bezeichnet. Lamellozyten dagegen sind relativ große, flache adhärente Zellen, die durch Einkapselung und Neutralisierung nicht-phagozytierbare sehr große Fremdkörper eliminieren. Lamellozyten kommen nicht in Embryonen und adulten Fliegen vor. In gesunden Larven sind sie äußerst selten und werden erst nach Infektion mit parasitären Wespeneiern zur Differenzierung und Freisetzung induziert. Die von den Lamellozyten eingekapselten Fremdkörper werden häufig durch die Phenoloxidase-Aktivität der Kristallzellen – dem dritten Hämozytentyp melanisiert und getötet (Wood and Jacinto, 2007).

Gemeinsam sind die drei Hämozytentypen für eine effiziente zelluläre Immunabwehr bei Verletzungen der Kutikula oder Eindringen von Pathogenen verantwortlich. Kleine Wunden der larvalen Kutikula werden schnell verschlossen, hervorgerufen durch Mechanismen die dem Wundverschluss beim Menschen ähneln (Abb. 23). Ähnlich wie bei Vertebraten, erfolgt die Hämatopoese bei *Drosophila* räumlich und zeitlich in unterschiedlichen Phasen.



**Abbildung 23: Immunabwehr bei *Drosophila*** (verändert nach Lemaitre and Hoffmann, 2007). **A.** Schematische Darstellung der drei larvalen Hämozytentypen, die an der zellulären Immunabwehr maßgeblich beteiligt sind. br Gehirn, hg Dorsalgefäß, lg Lymphdrüse, rg Ringdrüse, Vg Ventralganglion. **B.** Schematisches Modell des Wundschlusses bei *Drosophila*. Verletzung der larvalen Kutikula führt zur Rekrutierung von Plasmatozyten. Diese sekretieren Hemolectin, einen von Willebrand factor ähnlichen Faktor, der mit anderen Proteinen gemeinsam einen (Blut)-Pfropf bzw. Thrombus bildet. Spätere Quervernetzungen der Thrombus-Fibrillen erfolgen über Trans-Glutaminase und Phenoloxidase-Aktivität der Kristallzellen.

Im *Drosophila* Embryo differenzieren Hämozyten aus dem procephalen Bereich (im späten Stadium 10 als eine Subpopulation von Zellen erkennbar). Nach der letzten Teilung sind etwa 300 procephale Mesodermzellen auf jeder Seite des Embryos als Hämozyten zu identifizieren, die im weiteren Verlauf auswandern und sich über den gesamten Embryo verteilen. Diese zirkulierenden Hämozyten sind ausschließlich Plasmatozyten und persistieren in allen Larvalstadien. Die zweite Welle der Hämatopoese erfolgt in der Lymphdrüse, einem paarigen Organ, das als bilaterale Kette den anterioren Bereich des Dorsalgefäßes in der Larve flankiert (vgl. Abb. 8A). Unter normalen, nicht immunogenen Bedingungen verlassen die ausdifferenzierten Hämozyten erst zu Beginn der Metamorphose die Lymphdrüse und sind maßgeblich am Abbau der larvalen Organ-/Zellstrukturen durch Phagozytose beteiligt.

# Fluoreszenzmikroskopie

## Auflichtfluoreszenz

Bei der Auflichtfluoreszenz wird das Objekt von oben durch das Objektiv beleuchtet, dieses dient daher gleichzeitig auch als Kondensor.

Das Anregungslicht wird durch einen **dichroitischen Spiegel** in den Strahlengang eingekoppelt. Dieser ist spezifisch für jede Anregungswellenlänge; das Licht wird reflektiert und durch das Objektiv auf das Präparat gelenkt.

Das vom Präparat emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv wieder aufgefangen und kann anschließend den dichroitischen Spiegel passieren.

Vom Anregungslicht gelangt nur ein sehr kleiner Anteil zurück ins Objektiv, der Großteil davon wird vom dichroitischen Spiegel reflektiert und zur Lampe zurück gelenkt.

Vom Sperrfilter kann die geringe Menge an Anregungslicht, die noch durch den dichroitischen Filter gelangt, absorbiert werden, und man erhält einen dunklen Hintergrund. Vom Sperrfilter werden auch noch alle anderen unerwünschten Fluoreszenz-Wellenlängen absorbiert.

(Quelle: <http://www.univie.ac.at/mikroskopie> und Unterseiten

Da ein großflächiger Bereich der Probe gleichzeitig beleuchtet wird, erhält man direkt Information über einen großflächigen Messbereich der Probe. Folglich ist ein Abrastern der Probe nicht erforderlich.

Nachteilig an dieser Technik ist, dass viele beleuchtete Ebenen übereinander liegen und gleichzeitig detektiert werden, sodass nur dünnere Proben (wenige Ebenen) sinnvoll vermessbar sind. Bei dickeren Proben führt die mangelnde axiale Auflösung zu einem unscharfen und damit unbrauchbaren Bild.

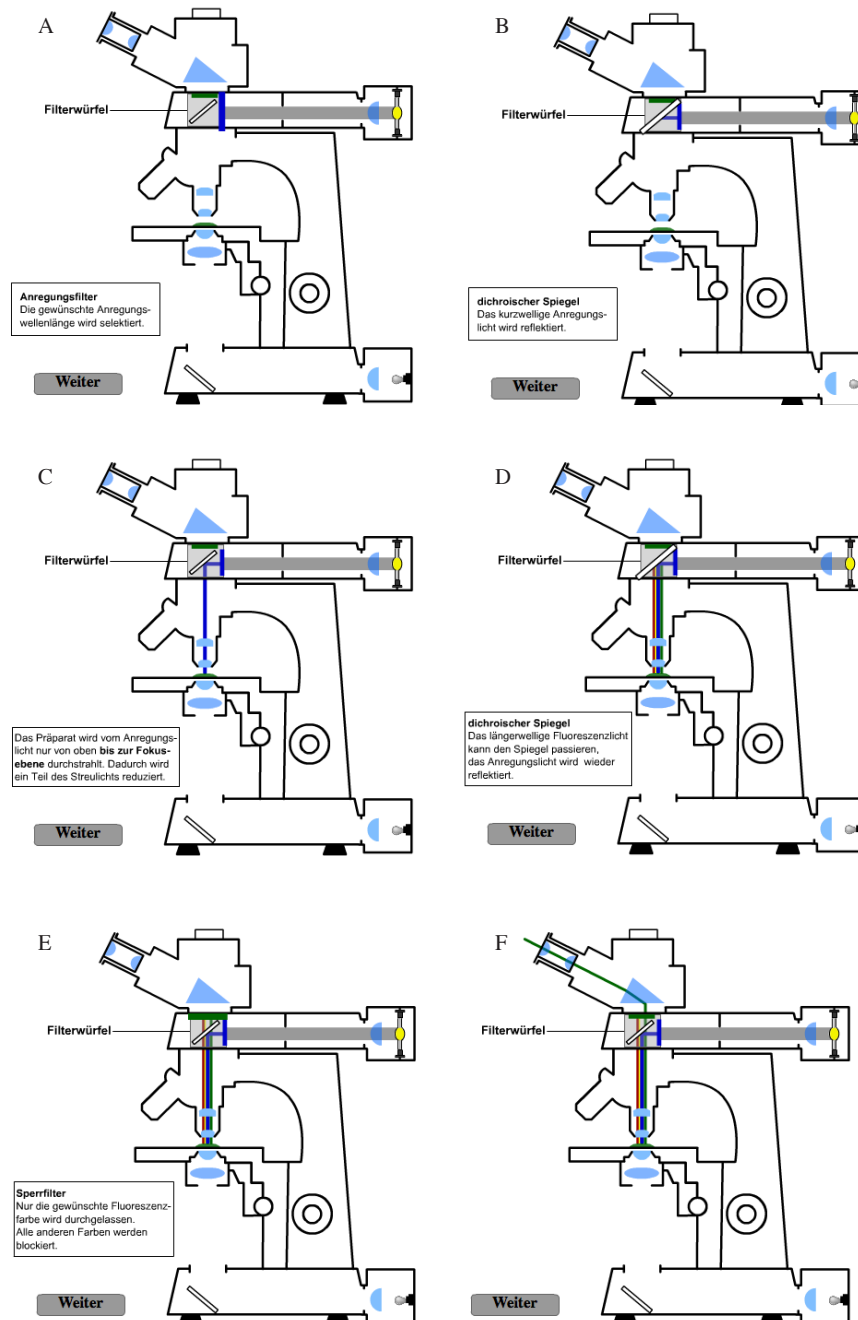
## Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird das Licht auf einen Punkt in der Probe fokussiert. Das von diesem Punkt der Probe ausgehende Licht wiederum wird auf die Eingangslochblende des Detektors fokussiert und anschließend im Detektor detektiert.

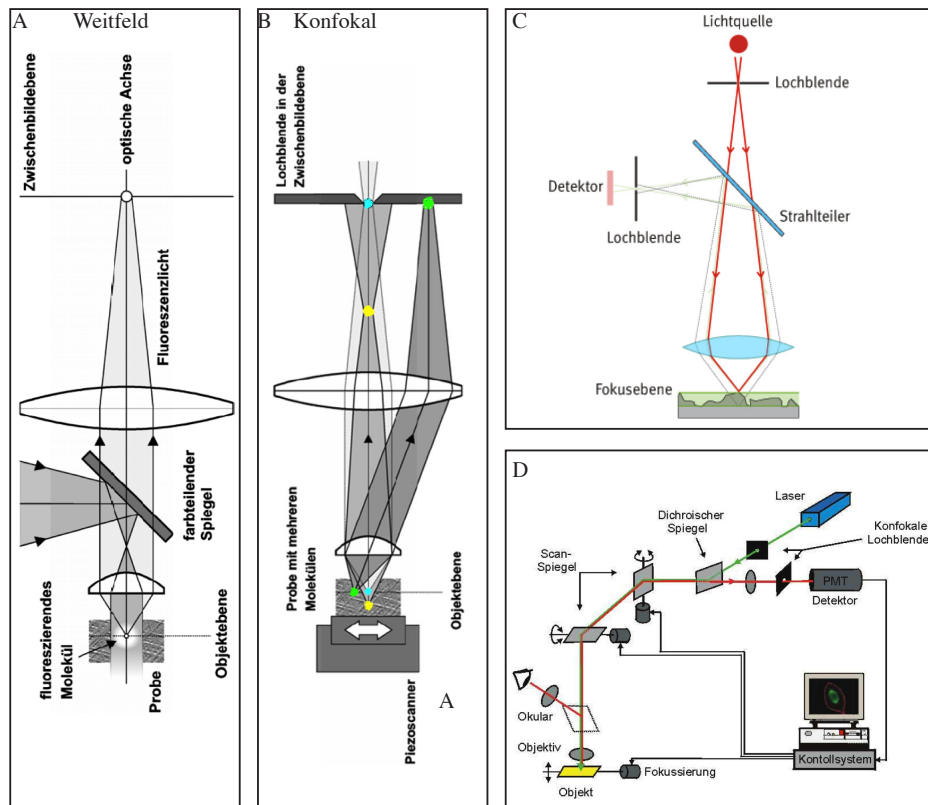
Im Abbildung 25 ist klar zu erkennen, dass Licht aus nicht fokalen Ebenen nicht auf die Lochblende fokussiert wird und damit auch nur in sehr geringem Maße detektiert wird.

Da bedingt durch das Messprinzip stets nur ein Punkt der Probe gemessen wird, ist zur Bildgenerierung ein Abrastern der Probe erforderlich. Dieses Bild kann nicht nur 2 dimensional sein, sondern auch 3 dimensional, da auch eine Messung entlang der optischen Achse möglich ist. Die Bildgenerierung erfolgt am Computer durch „Zusammensetzen“ der einzelnen Messungen

(Quelle: Schubert, M. Prinzip der konfokalen Mikroskopie. [www.uni-mainz.de/FB/.../KonfokaleMikroskopie\\_Schubert.ppt](http://www.uni-mainz.de/FB/.../KonfokaleMikroskopie_Schubert.ppt))



**Abbildung 24: Strahlengang des Lichts in der Auflicht- Weitfeld- Fluoreszenzmikroskopie.**  
Erklärung siehe Text



**Abbildung 25: Vergleich von Weitfeld und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie:** A) Weitfeld, B, C) konfokal, D) Komponenten der technischen Umsetzung eines konfokalen Mikroskops. Weitere Erklärung siehe Text.

## Spinning-Disc-Konfokale Mikroskopie: Analyse von Zellbewegungen in vivo

Mit Hilfe des Spinning-Disc-Konfokalmikroskops können sehr schnelle Prozesse in lebenden Zellen untersucht werden. Die Belastung für die lebenden Proben durch Laserlicht ist dabei sehr gering. Im Gegensatz zu den „klassischen“ konfokalen Systemen mit `Punktsclannern`, in denen ein Laserstrahl die Probe abtastet, wird der Laserstrahl im Spinning-Disc Mikroskop durch eine (rotierende) Nipkow Scheibe mit Mikrolinsen in 1000 parallele Laserstrahlen zerlegt, die das Präparat wie 1.000 parallelgeschaltete konfokale Einheiten abtasten (Abb 9).

Während konventionelle Laser Scanning Mikroskope einen Photomultiplier [PMT] verwenden, um die sequentiell erhaltene Bildpunktinformation als Bild zu rekonstruieren, arbeitet das Nipkow-Scheiben basierende System mit einer CCD Kamera, die simultan die erhaltene Information als Bild aufzeichnet. Die CCD Kamera-Technologie hat gegenüber den PMTs den Vorteil, dass die Quantenausbeute höher ist und eine verbesserte zeitliche Auflösung erlaubt. Die klassischen Laser Scan Mikroskope können nur einige wenige hochaufgelöste Bilder pro Sekunde abgebildet werden. Im Spinning-Disc Mikroskop werden von der CCD Kamera simultan 1.000 Punkte erfasst. Dies erlaubt es bis zu 50 Bildern pro Sekunde aufzuzeichnen.

Um zwischen verschiedenen Laserlinien schnell hin und her zu schalten, wird ein AOTF [Acusto Optical Tuneable Filter] verwendet. Ein präzises Scannen der Probe in der Z-Achse wird durch einen Piezo- z-Motor gewährleistet. Durch diese Techniken ist eine multidimensionale Analyse im Lebendpräparat möglich. Im Praktikum werden larvale

Hämozyten *ex vivo* sowie pupale Hämozyten *in vivo* aufgenommen. Zur Visualisierung werden transgene Fliegen verwendet, die unter der Kontrolle des Hämozyten-spezifischen *hemolymph* (*hmlΔ-gal4*) Promoters zytoplasmatisches EGFP exprimieren.

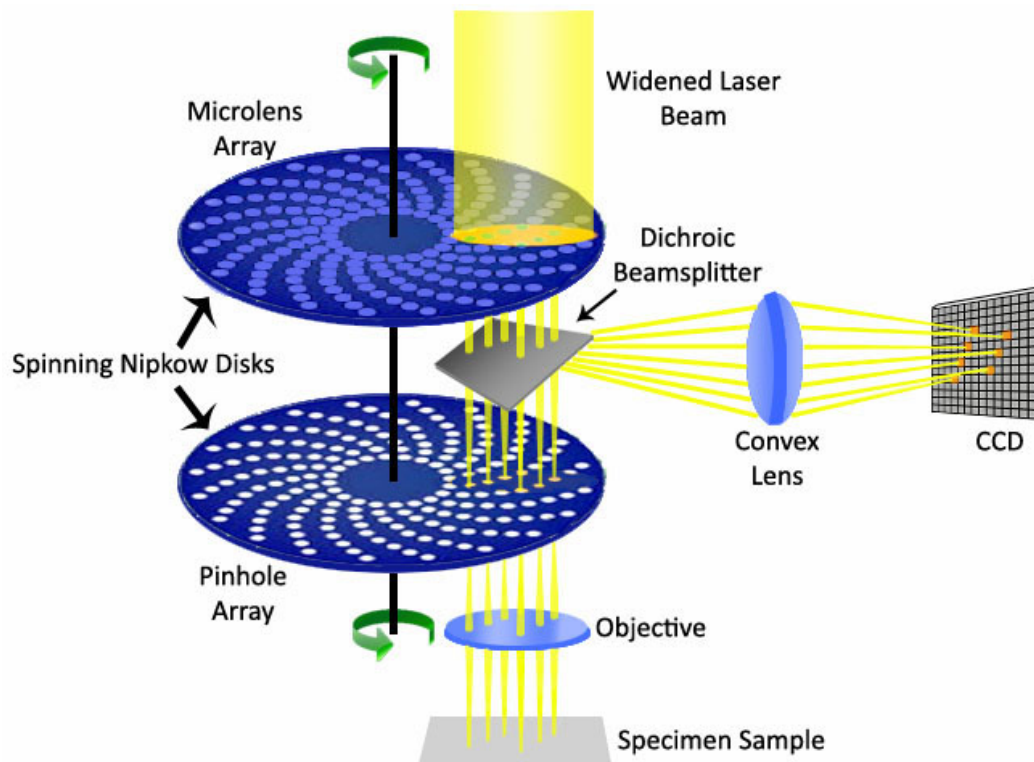


Abbildung 26: Prinzip des Spinning-Disc-Konfokalmikroskops (Quelle: Zeiss). Erklärung i. Text

## Structured Illumination Mikroskopie (SIM) - Superauflösende Strukturierte Beleuchtung

Die Grundlage des SIM-Verfahrens ist herkömmliche Lichtmikroskopie, allerdings mit einer besonderen Beleuchtungstechnik. Hierzu werden die Proben (z.B. fixierte Zellen, angefärbt mit Fluoreszenzfarbstoffen oder lebende, GFP exprimierende Zellen) in verschiedenen Ebenen mit einem bekannten und sehr feinen Muster aus Licht bestrahlt. Das führt zu Interferenzen mit den Strukturen der Probe, die sich als Schattenmuster zeigen.

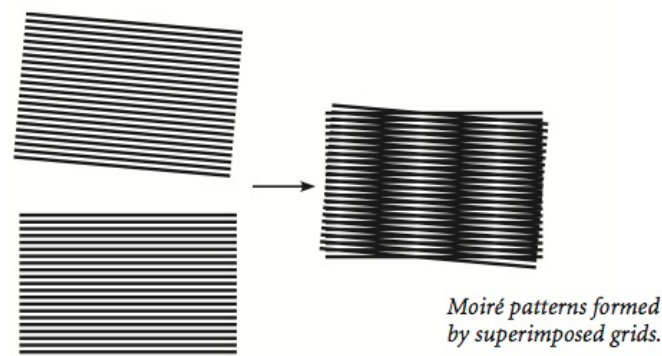
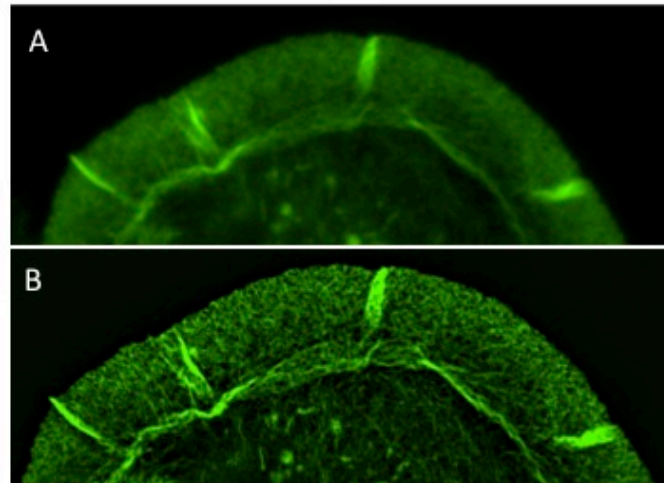


Abbildung 27: Das Prinzip der Strukturierten Beleuchtung. Das SIM nutzt die Bildung von Moiré-Bildern, die sich durch Überlagerung von zwei Mustern ergeben. Die Probe wird über einen speziellen SIM-Illuminator mit einem definierten Gittermuster beleuchtet. Dieses Beleuchtungsmuster wird schnell und präzise gedreht und verschoben. Die jeweils entstehenden Moiré-Bilder werden über die Optik und eine hoch empfindliche CCD-Kamera aufgenommen. Spezielle Software-Algorithmen extrahieren die Information in den jeweiligen Moiré-Bildern und übersetzen sie in zwei- und dreidimensionale, hoch auflösende Rekonstruktionen der Probe.



Eine ähnliche wellenförmige Interferenz ist in der Grafik als sogenannter Moiré-Effekt bekannt und entsteht etwa beim Einscannen von gedruckten Bildern (Abb. 27).

Diese auf den ersten Blick störenden Interferenzmuster enthalten zusätzliche Bildinformationen. Aus den Interferenzmustern der Rohdaten wird durch den nachgeschalteten Software-Algorithmus die Superauflösungs-Bildinformation generiert. Dabei sind Strukturen mit einer lateralen Auflösung von rund 120 nm mehrfarbig darstellbar (Abb. 28).



**Abbildung 28: Structured Illumination Mikroskopie des kortikalen Aktin-Zytoskeletts einer S2R+ Zelle (gefärbt mit Phalloidin-Alexa488). A. Weitfeld- B. SIM-Aufnahme.**

## Literatur:

1. Insall, R.H., and Machesky, L.M. (2009). Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* 17, 310-322.
2. Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 37-48.
3. Gohl, C., Banovic, D., Grevelhoerster, A., and Bogdan, S. (2010) *J Biol Chem* 285, NO. 51, pp. 40171–40179
4. Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697-743.
5. Rogers, S.L., Wiedemann, U., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol* 162, 1079-1088.
6. Stephan, R., Gohl, C., Fleige, A., Klambt, C., and Bogdan, S. (2011). Membrane targeted WAVE mediates photoreceptor axon targeting in the absence of the WAVE complex in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*.
7. Wood, W., and Jacinto, A. (2007). *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 542-551.
8. Mejillano, M. R., Kojima, S., Applewhite, D. A., Gertler, F. B., Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118, 363-73
9. Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9, 1110-1121.



10. Derivery, E., and Gautreau, A. (2010). Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *Bioessays* 32, 119-131.
11. Stephens, D. J. and Allan, V. J. (2003) Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300: 82- 86.

# Material- und Methodensammlung

## Fliegenzucht

*Drosophila*-Standardmedium: Pro Liter Leitungswasser: 8,5 g Agar Agar und 77 g Maismehl unter Rühren aufkochen, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt, 41 g Rübensirup hinzugeben, auf 60°C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 2 ml Nipagin (10% in 70% EtOH) hinzugeben.

*Drosophila* kann auf einem sehr einfachen Medium gehalten werden. In der Regel werden kleine Zuchtgefäße von 15-150 ml Inhalt verwendet, die mit Schaumstoff-, Watte- oder Zellstoffstopfen verschlossen werden. In den größeren "Töpfen" können bis zu 100 Fliegen gehalten werden. Die Zahl der Nachkommen hängt von einer Reihe von Faktoren ab:

- der Zahl der Eltern
- der Dauer der Eiablage (Tage der Eltern im Topf)
- der Temperatur (bei 18°C entwickeln sich die meisten Stämme nur halb so gut wie bei 25°C)
- der genetischen Konstitution der Elterntiere und der Nachkommen
- der Futterqualität

In kleinen Töpfen ergeben 3-20 Elterntiere ca. 100 Nachkommen in der F1 Generation, in großen Töpfen können 10-40 Elterntiere ca. 500 Nachkommen produzieren. Für die Nachkommenzahl ist die Zahl der Väter nicht sehr entscheidend, es können 5mal so viel Weibchen wie Männchen verwendet werden.

Da die Weibchen mitunter sehr schnell eine große Zahl von Nachkommen produzieren, sollte die Elterngeneration nach einigen Tagen (sobald der Futterbrei zu „leben“ beginnt) in ein frisches Gefäß überführt oder entfernt werden. Hierzu setzt man sich ein Fliegengrab an: Eine 1 l Flasche wird mit etwa 0,5 l vergälltem Alkohol gefüllt und mit einem großen Trichter versehen. Hier hinein können die überzähligen Fliegen geschüttet werden. Das Überführen der Fliegen von einem Gefäß in ein anderes oder in das Fliegengrab erfordert das Öffnen des Zuchtgefäßes. Dies kann zumindest anfänglich mit einer großen Flucht der Fliegen verbunden sein. Um dies zu vermeiden, sollte man mit den Fingern an die Gefäßwand trommeln. Die Fliegen können bei Erschütterungen nicht losfliegen und verbleiben somit im Gefäß. Nachdem die Fliegen geschlüpft sind, sollten die Töpfe möglichst nicht länger als eine Generation aufgehoben werden. Vor der Entsorgung der Zuchtgefäße müssen diese zum Abtöten der Kulturen für 1-2 Tage in der Tiefkühltruhe aufbewahrt werden.

Die Entwicklungszeiten sind stark temperaturabhängig. Von der Eiablage bis zum Schlüpfen der erwachsenen Fliegen vergehen:

- ca. 3 Wochen bei 18°C
- ca. 12 - 14 Tage bei Zimmertemperatur (20°C)
- ca. 10 Tage bei 25°C.

Die Weibchen schlüpfen in der Regel als erste aus der Puppenhülle.

## Selektion virgineller Weibchen

Männchen und virginelle Weibchen (Jungfrauen) sind am leichtesten an Ihrer Form zu erkennen. Männchen haben ein dunkleres, "stumpfes" Abdomen, Jungfrauen haben ein spitzeres, größeres Abdomen.

Die Jungfräulichkeit von frisch geschlüpften Weibchen hängt vom Alter ihrer Brüder ab, die zur Geschlechtsreife die folgenden Zeiten brauchen:

- ca. 24 Std. bei 18°C
- ca. 6 Std. bei Zimmertemperatur

Regel: Am Abend (18:00 Uhr) alle Fliegen aus den Töpfen entfernen. Töpfe bei Zimmertemperatur stehen lassen, wenn man um 9:00 Uhr morgens Jungfrauen sammeln will oder über Nacht auf 18°C stellen, wenn man erst später am Vormittag zum Jungfrauen-Sammeln kommt. Dies ist möglich, da die Fliegen erst in den frühen Morgenstunden aus der Puppenhülle schlüpfen. Über Tag ca. alle 5-6 Stunden die frisch geschlüpften Jungfrauen sammeln. Wenn man abends nicht alle Fliegen entfernt hat, bzw. morgens der Zeitpunkt verpasst wurde, dürfen nur die ganz jungen, frisch geschlüpften Fliegen gesammelt werden. Alle Weibchen mit einem braun durchschimmernden Darm (Meconium) können verwendet werden. Bei sehr kritischen Experimenten sollte man die Jungfrauen vor dem Kreuzen altern lassen und das Futter auf Larven hin untersuchen (auch jungfräuliche Weibchen legen nach etwa zwei Wochen Eier, die allerdings unbefruchtet sind).

Ein übersehenes Männchen kann sehr großen Schaden anrichten, da dieses etwa drei Weibchen pro Tag begatten kann! Als Anfänger sollte man die Jungfrauen daher besser in kleineren Portionen sammeln (20 Fliegen/Topf). Das Alter der Männchen ist für die Kreuzung relativ unerheblich. Allerdings können Männchen, wenn sie zu lange mit CO<sub>2</sub> betäubt wurden, steril werden.

### ...Monokulturen haben Feinde

Leider finden sich in Laborstämmen häufig nicht nur Fliegen sondern ebenfalls Milben, die eine Zucht oder Kreuzungsarbeit deutlich erschweren können. Um einem Befall vorzubeugen, sollten die geschlüpften Fliegen recht rasch auf neue Zuchttöpfe umgesetzt werden. Da Milben einen etwas längeren Generationszyklus haben, gelingt es mit dieser einfachen Maßnahme oft, das Problem in den Griff zu bekommen. Ein weiterer Störfaktor in der Zucht von *Drosophila* sind Pilze und Bakterien, die im Futter unkontrolliert wachsen und schnell zur Konkurrenz für die Fliegen werden. Aus diesem Grund werden dem Futter das Fungizid „Nipagin“ und Propionsäure beigemischt. Falls eine solche Futtermischung nicht möglich ist, hilft es oft, die Fliegen in hinreichender Dichte (ca. 50 Fliegen auf 30 ml Futter) in einem Zuchtgefäß zu halten.

## ***whole-mount* Antikörperfärbung von *Drosophila*-Embryonen**

### **Material**

Ablagegefäße (z.B. Tri Pour Becher 100 ml (Plano G3351), ggf. kleine Belüftungslöcher mit Nadel stechen)

3,6% Agar-Agar in H<sub>2</sub>O kochen, mit etwas Essig versetzen. In passende Ablageschalen, z.B. 5 cm Petrischalen, füllen und nach Erkalten mit Bäckerhefe bestreichen.

Der zu untersuchende Fliegenstamm wird zur Ablage gebracht und die Ablagen täglich gewechselt.

NaOCl, PBT, PBS, n-Heptan, Formaldehyd, Methanol, Ethanol, Antikörper NBT, BCIP, DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Glycerin

### **Methode**

#### Fixierung der Embryonen

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 50% NaOCl für 4 min
- gründlich mit H<sub>2</sub>O waschen
- auf Apura-Papier gut trocknen
- Überführung der MWP in Heptan
- Überführung der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml Glasröhrchen
- Zugabe des gleichen Volumens an Fixierungslösung (4% Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- zur Devitellinisierung ca. 10 sec kräftig schütteln
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurz schütteln
- Abnahme des Methanols und 1 x mit 96% Ethanol waschen

#### Inkubation der Antikörper

- 3 x kurz und anschließend 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation in 10% Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT
- Inkubation des primären AK in geeigneter Verdünnung in 10% GS/PBT bei 4°C ü. N.
- 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10% GS/PBT für 2-3 h bei RT

- 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen.
- eindeckeln

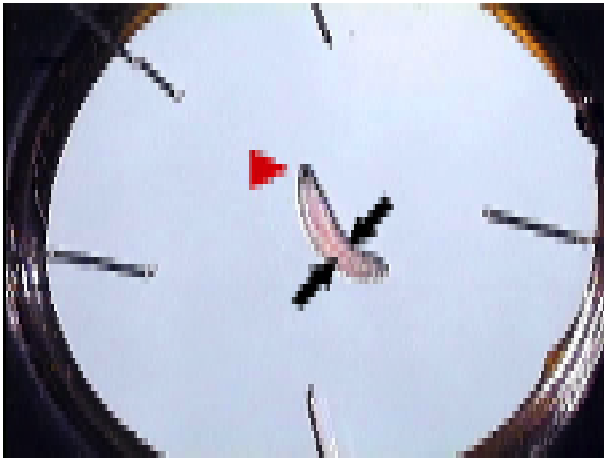
## **Fixierung von Larvengehirnen und Imaginalscheiben**

- “wandernde” L3-Larven mit Pinsel oder Pinzette aus Kulturröhrchen in Blockschälchen mit PBS überführen
- kaltes PBS reduziert die Aktivität der Larven und erleichtert die Präparation
- ggf mit PBS waschen um Reste von Futterbrei zu entfernen
- Larve mit zwei Pinzetten fassen, an Mundhaken und Ende des vorderen Drittels der Larve
- Larve vorsichtig auseinander ziehen
- idealerweise erhält man Mundhaken, ZNS mit optischen Loben, und Imaginalscheiben und Darm
- Gehirne etc in 900 Microliter eiskaltem PBS sammeln
- nach Zugabe von 100 Microlitern 37% Formaldehyds 20 min auf Schüttler oder Rotor bei Raumtemperatur fixieren
- Fixierung durch Abnahme des Fixans (geeignete Entsorgung beachten) beenden, mit PBT waschen
- 3x 15 min mit PBT waschen
- 1 h in 10% Ziegenserum in PBT blocken
- Inkubation in 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung über Nacht bei 4°C
- 3x 15 min mit PBT waschen
- Inkubation in 2. Antikörper in geeigneter Verdünnung bei Raumtemperatur für 2-3 h
- 3x 15 min mit PBT waschen
- je nach Verwendung eindeckeln (mit Fluoromount/ Vectashield) oder nachpräparieren und dann eindeckeln

## **Protokoll zur immunohistochemischen Färbung des ZNS und seiner abgehenden Nerven im larvalen Filet**

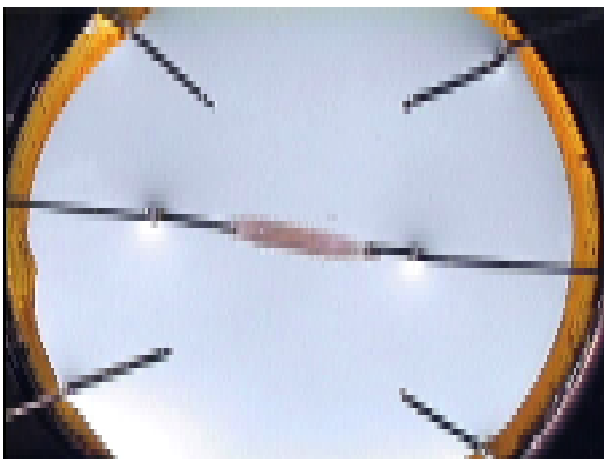
### **Larvenpräparation:**

1a.) Larven im dritten Larvalstadium werden mittels einer Pinzette von der Gefäßwandung gepickt und zum Waschen in ein Uhrglasschälchen mit PBS überführt. Die Larve wird mit der Pinzette in PBS hin- und herbewegt bis alle Futter- und Häutungsreste entfernt sind.



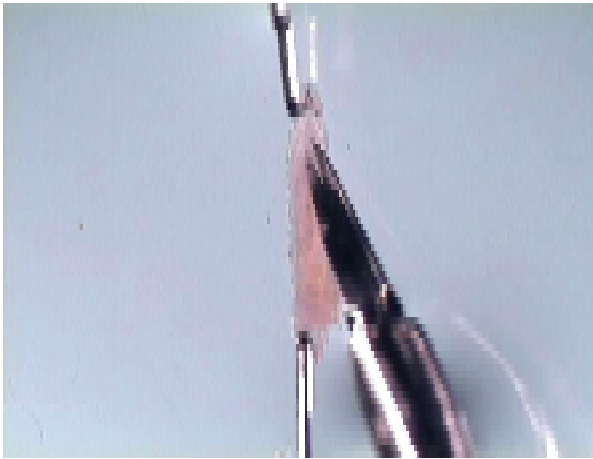
**Abb. 29:** Die schwarzen Mundhaken (roter Pfeil) markieren das Vorderende einer *Drosophila* Larve, die röhrenförmige Tracheen (schwarze Pfeile) befinden sich auf der dorsalen Körperseite.

1b.) Mit einer Pasteurpipette wird ca. 1ml PBS auf eine Sylgaard- oder Gummiplatte pipettiert und sechs Insektennadeln daneben platziert. Die gesäuberte Larve wird in das PBS auf der Platte überführt. Soll die Larve dorsal aufgeschnitten werden, so wird eine Nadel zwischen die beiden Haupttracheen (dorsal) am posterioren Ende der Larve gesteckt. Eine zweite Nadel wird am anterioren Ende auf Höhe der schwarzen Mundhaken durch den Kopf gesteckt. Es empfiehlt sich die Larve danach mit einer der beiden Nadeln noch einmal ganz auszustrecken.



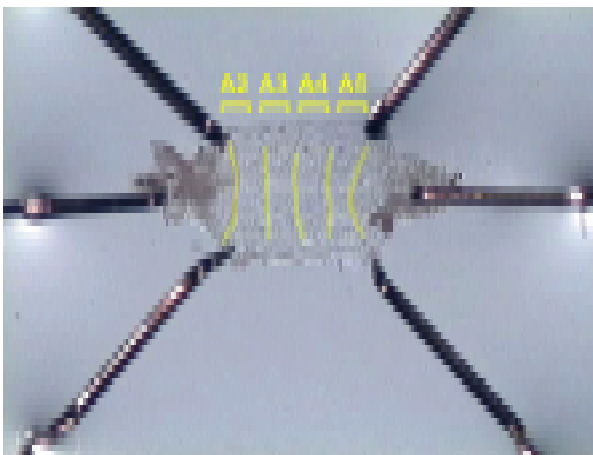
**Abb. 30:** Die Larve wird mit zwei Nadeln gestreckt.

1c.) Danach wird ein kleiner Schnitt in der Nähe der posterioren Nadel quer zur Längsachse durchgeführt. Der Schnitt soll nur die dorsale Körperhälfte durchtrennen und nicht das Tier ventral durchschneiden. Durch den hohen Innendruck quillt der Darm aus der Öffnung. Danach wird ein nicht-durchtrennender Schnitt am anterioren Kopfende quer zur Längsachse gesetzt. Von dem posterioren Querschnitt ausgehend wird die Epidermis der Larve oberflächlich entlang der dorsalen Mittellinie bis zum anterioren Querschnitt (zwischen den beiden Haupttracheen) aufgeschnitten. Durch die Schnittöffnung werden die inneren Organe mit spitzen Pinzetten entfernt.



**Abb. 31:** Die Larve wird entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten.

1d.) Danach wird der Torso aufgeklappt. Die vier "Ecken" werden mit je einer Nadel aufgespannt und auf der Sylgaard-Platte fixiert. Der Torso muss möglichst straff gespannt sein und flach und parallel zur Oberfläche der Platte fixiert sein, damit er später möglichst dünn unter ein Deckglas gelegt werden kann. Dann werden noch letzte Gewebereste, z.B. Imaginalscheiben oder Speicheldrüsen, mit scharfen Pinzetten entfernt. Die peripheren Nerven und das Gehirn werden oft mitgefärbt und verbleiben im Torso.



**Abb. 32:** Der larvale Hautmuskelschlauch wird mit 6 Nadeln aufgespannt. Die einzelnen abdominalen Segmente (A2-A5) sind erkennbar.

1e.) Der Torso in PBS gewaschen, um die herausgenommenen Gewebe wegzuwaschen. Das PBS mit den Geweberesten wird mit einer Pasteurpipette aufgesaugt und in ein Abfallgefäß pipettiert. Danach wird der Torso 3x mit 1 ml PBS waschen, dabei empfiehlt es sich das PBS von verschiedenen Seiten zuzugeben und abzusaugen, um alle Gewebereste zu entfernen.

1f.) Anschließend wird der Torso fixiert. Dazu wird der Torso zuerst 2x mit ca. 0,5ml 3,7%iges Formaldehyd in PBS gewaschen (ca. 30 sec). Dann wird er 15 min mit 1 ml 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Während der Fixierung wird das Präparat unter die Abzugshaube gestellt. In der Zwischenzeit kann eine zweite Präparation beginnen. Um das Formaldehyd wieder zu entfernen, wird das Präparat 3x mit PBS gewaschen. Danach werden alle 6 Nadeln vorsichtig entfernt. Dazu wird randständiges Gewebe in der Nähe einer Nadel mit einer Pinzette leicht auf die Sylgaard-Platte gedrückt.

Anschließend wird die Nadel mit einer zweiten Pinzette herausgezogen. Wenn alle Nadeln entfernt sind, wird das Hautmuskelpreparat in ein beschriftetes Eppendorf-Gefäß mit 500 µl PTX (PBS plus 0.1% Triton X-100) überführt. Während der Überführung fällt der Torso in sich zusammen. Er ist richtig fixiert, wenn er sich beim Eintauchen in das PTX wieder entfaltet und eine "lederne" Struktur aufweist. Verschiedene Genotypen können in einem Gefäß gefärbt werden, wenn sie durch Abschneiden der posterioren Tracheenöffnungen oder der Mundhaken markiert werden.

## **2. Antikörperfärbung**

2a.) Die fixierten Hautmuskelpreparate werden nun eine Stunde auf einem Schüttler mit PTX gewaschen, wobei das PTX (500 µl) vier Mal erneuert wird. Die Filets sollten in der Flüssigkeit schwimmen und nicht am Deckel oder der Wandung kleben. Vor dem Wechsel der Flüssigkeiten unbedingt kontrollieren, ob alle Filets im PTX sind. Nicht in die Pipettenspitze einsaugen und nur soviel PTX entfernen, das die Filets ständig unterhalb des PTX Spiegels sind.

2b.) Danach wird das PTX durch 300 µl PTX + 5% NGS (normal goat serum) ersetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Proteine und Antikörper im Ziegsenserum sollen eine unspezifische Bindung der primären und sekundären Antikörper verhindern. Die Filets werden auf einem Schüttler 1 h bei Raumtemperatur in PTX + 5% NGS inkubiert.

2c.) Anschließend werden abhängig vom Verdünnungsverhältnis eine bestimmte Menge (X µl) der primären Antikörper hinzugegeben. Das Präparat wird für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 ° C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Färbung werden nicht-gebundene Antikörper mit 500 µl PTX wieder gewaschen (1 h, 4x 15 min mit PTX waschen).

2d.) Nach dem letzten Waschgang werden 400 µl PTX + 5% NGS zu den Filets gegeben und die fluoreszierenden Sekundärantikörper in der gewünschten Verdünnung hinzu pipettiert (meist 1:400). Die Sekundärantikörper werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (vor Lichteinfall schützen, da die Chromophore gebleicht werden können).

2e.) Nach der Färbung werden die Filets 4x mit 500 µl PTX gewaschen (je ca. 15 min). Falls gewünscht, können die Filets abschließend einmal mit PBS gespült werden, um das Triton zu verdünnen. Die Spüllösung wird abpipettiert und im letzten Arbeitsschritt werden 400 µl 70% Glyzerol (in PBS) zu den Filets gegeben. Das Eppendorf Gefäß durch "Schnippen" leicht schütteln und die Filets in Külschrank (4°C) stellen. Die Filets schwimmen anfänglich auf der Oberfläche und sinken durch Einlagerung von Glyzerol langsam ab. Dadurch wird das Gewebe geklärt. Sobald die Präparate in der Glyzerollösung abgesunken sind, können sie auf einen Objektträger gelegt werden.

## **3. Vorbereitung der Präparate zum Mikroskopieren (Mounting)**

Zuerst 20 µl 70% Glyzerol (in PBS) auf einen Objektträger pipettieren, dann ein oder mehrere Filets mit einer Pinzette vorsichtig in den Tropfen geben. Die Filets werden unter einem Stereomikroskop flach ausgebreitet (wichtig: mit der Innenseite des Torsos nach oben, Kutikula (Zähnenbänder!) nach unten). Die Kopf- und Schwanzenden werden mit einer Schere abgeschnitten. Mehrere Filets werden auf einer Linie in gleicher Orientierung nebeneinander gelegt. Danach wird ein Deckglass (22x22 mm, Dicke 1) schräg angesetzt und mithilfe einer Pinzette langsam auf das Präparat



abgesenkt (Vermeidung von Luftblasen). Überschüssiges Glycerol kann mit einem Papier herausgesaugt werden. Je flacher das Präparat ist, desto besser die Mikroskopierergebnisse. Das Deckgläschen wird danach mit Nagellack fixiert. 15 min trocknen lassen, danach können die Präparate mikroskopiert werden. Lagerung im Kühlschrank (4°C) bis zu einem Jahr möglich.

## **Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster***

### Material

Fliegenzylinder für Ablagen

Agarablageplatten

- 18g Agar in 500 ml Leitungswasser aufkochen (Vorsicht Siedeverzug, etwas abkühlen lassen und 1ml 50% Essigsäure zugeben, Agar in Petrischalen gießen

Petrischale mit Fliegenfutter + Hefe

- Futter von 1-2 großen Fliegenröhrchen in Mikrowelle aufkochen und in Petrischale gießen, erkalten lassen und behefen

50% NaOH

Heptankleber

Netzchen zum Dechorionisieren

Netzchenstücke zum Embryonentransfer auf Agarblöckchen

### Vorbereiten der Embryonen

- Am Vortag des Tages der Injektion Fliegen auf Ablage bringen
  - Junge, befruchtete und eierlegende Fliegen (optimalerweise ca 3-5 Tage nach Schlupf) von mindestens gut besetzten 6-8 großen Röhrchen (besser mehr) auf einen Ablagezylinder überführen
  - Ablagezylinder mit Petrischale mit Fliegenfutter und Hefe über Nacht bei 18° halten
- Am Tag der Injektion
  - am Morgen Fliegen in 25° Inkubator stellen und Ablagen auf Agarablageplatten mit Hefe wechseln, danach alle 30- 60 Minuten wechseln
    - die Ablagen der ersten zwei Stunden können eigentlich sofort verworfen werden, da die Embryonen dann noch zu asynchron und zu alt sind.
- weiterhin die Ablagen etwa alle 30 - 60 Minuten wechseln und die Embryonen darauf direkt für die Injektion vorbereiten.
- nach der Ablage die Embryonen mit Leitungswasser und Pinsel in ein Netzchen überführen
- Netzchen spülen bis die Hefereste abgespült sind
- nach dem Waschen erfolgt die Dechorionisierung der Embryonen in 50 %iger Klorix-Lösung für etwa 3 Minuten.
- die Embryonen mit Leitungswasser waschen bis das Siebchen nicht mehr nach Chlor riecht
- Embryonen im Sieb im Blockschälchen mit Leitungswasser stellen
- Embryonen mit Netzchenstück fischen, vorsichtig trocknen und auf einen Streifen Apfelsaftagar überführen
- die Embryonen mit einer stumpfen Präpariernadel so ausrichten, dass die

- Mikropylen aller Embryonen in die gleiche Richtung zeigen
- aufkleben der Embryonen in ihrer definitiven Orientierung durch das vorsichtige Auflegen eines mit Heptankleber beschichteten Deckglases auf den Agarstreifen
- die Embryonen nun so lange trocknen, bis die Vitellinmembran beim Berühren mit der Präpariernadel reversible Falten wirft (vermindert den Innendruck und somit das Risiko des Platzens und Auslaufens der Embryonen bei der Injektion)
- die getrockneten Embryonen mit luftdurchlässigem 10S-Voltalef-Fluorocarbonöl überschichten und bis zum Beginn der Injektionen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahren

#### DNA-Mikroinjektion

Injektionspuffer (0,77mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,22mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mM KCl, pH7,4)

Vorbereiten der Injektionslösung

Komponente	Volumen
DNA (2-5µg)	X
RNA (250ng/µl)	abhängig von Konzentration der Präparation
10x Injektionspuffer	1,5 µl
(optional) Phenolrot-Lösung	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	add 15 µl

Alle Komponenten werden für 1 Minute in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, zusammengesetzt, erneut abzentrifugiert und in ein neues Eppli transferiert um ein Verstopfen der Nadel zu vermeiden

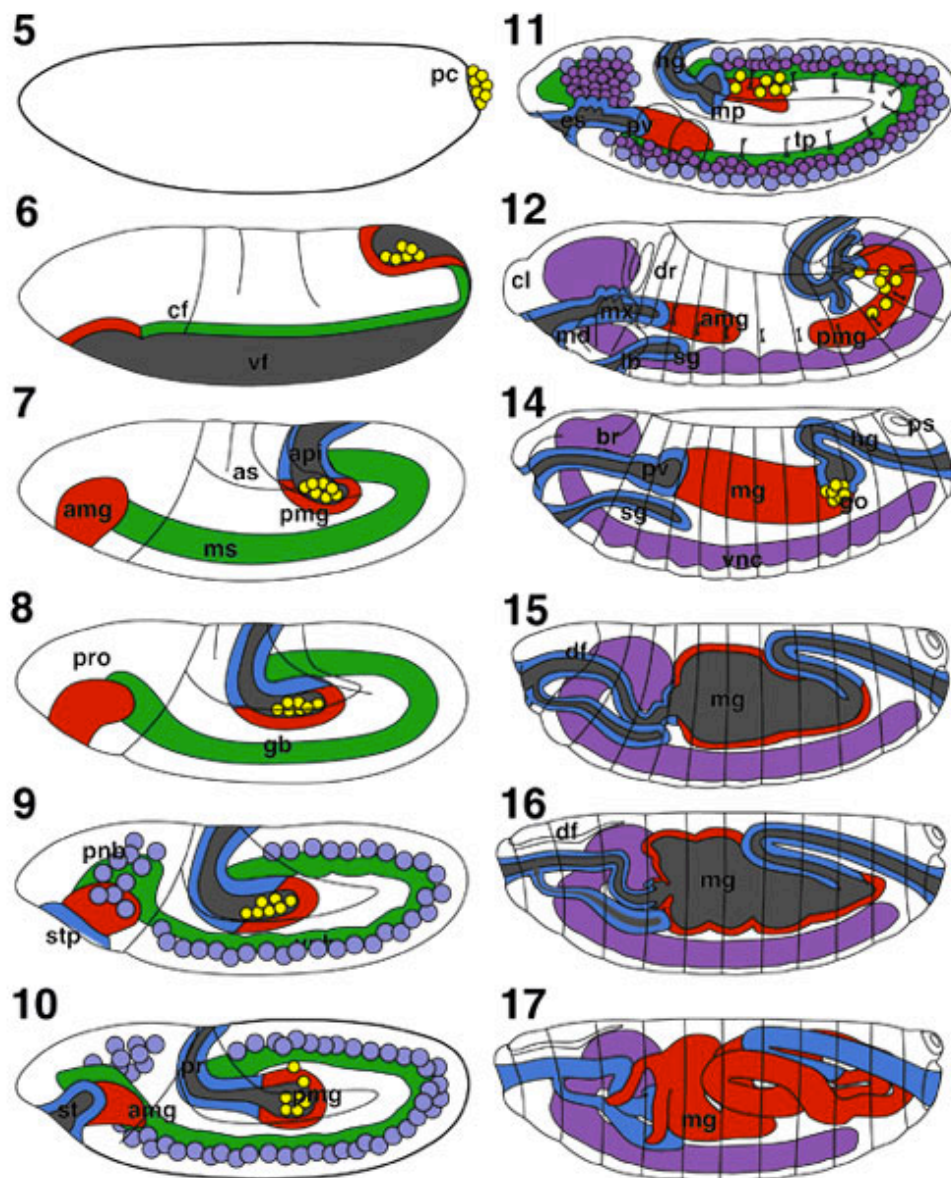
- Nadel zur Injektion mit 2,5 µl mittels Befüllkapillare ganz vorne beladen und mit dem Spannkopf am Universalhalter eingespannen.
- Nadel auf den Objektträger ins 3S Öl abgelassen
- testen ob die Nadel durchlässig ist (Test-pI ca 5 psi), ggf Nadel spülen und entlüften dann auf geeigneten Druck einstellen (0-15 psi)
- Embryonen und Nadel unter dem Mikroskop in einer Ebene ausrichten

Injektionen erfolgen in den posterioren Pol von Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm-Stadium befinden

- mit Hilfe des Drucksystems einen kleiner Tropfen der Injektionslösung in den Bereich der späteren Polzellen (für Keimbahntransformation) entlassen
- ausgelaufene oder zu alte Embryonen mit der Kapillare durchstechen und so abtöten.
- nach der Injektion das Deckglas in ein Wägeschälchen überführen und mit 3 S-Öl (Voltalef) überschichten.
- die Embryonen bis zum Schlüpfen bei 18 °C halten.
- geschlüpfte L1-Larven mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila*-Standardmedium überführen.
-

## Übersichtsbilder

## Overview of the Stages of Development



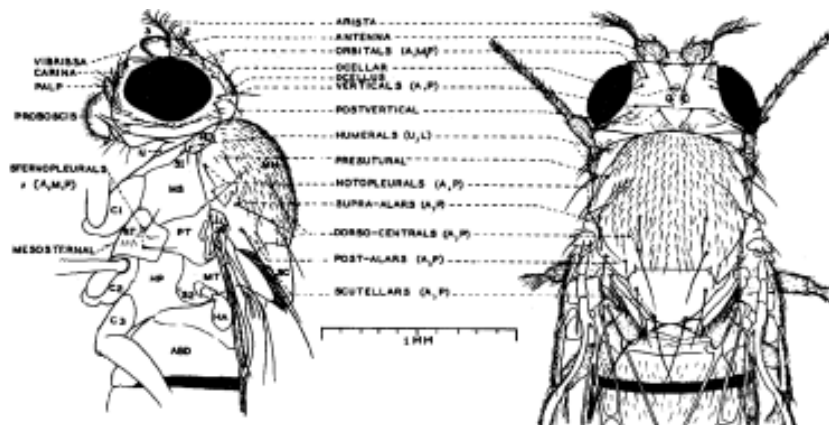


Abbildung 33: Kopf und Thorax von *Drosophila*

A	anterior	M	middle	S	Sternit
ABD	Abdomen	MN	Mesonotum	S1, S2	thoracic Spiracles
C1- C3	Coxae	MS	Mesopleura	SC	Scutellum
HA	Haltere	MT	Metanotum	ST	Sternopleura
HP	Hypopleura	N	Neck	T	Tergit
HU	Humerus	P	posterior	U	upper
L	lower	PT	Pteropleura	W	Wing

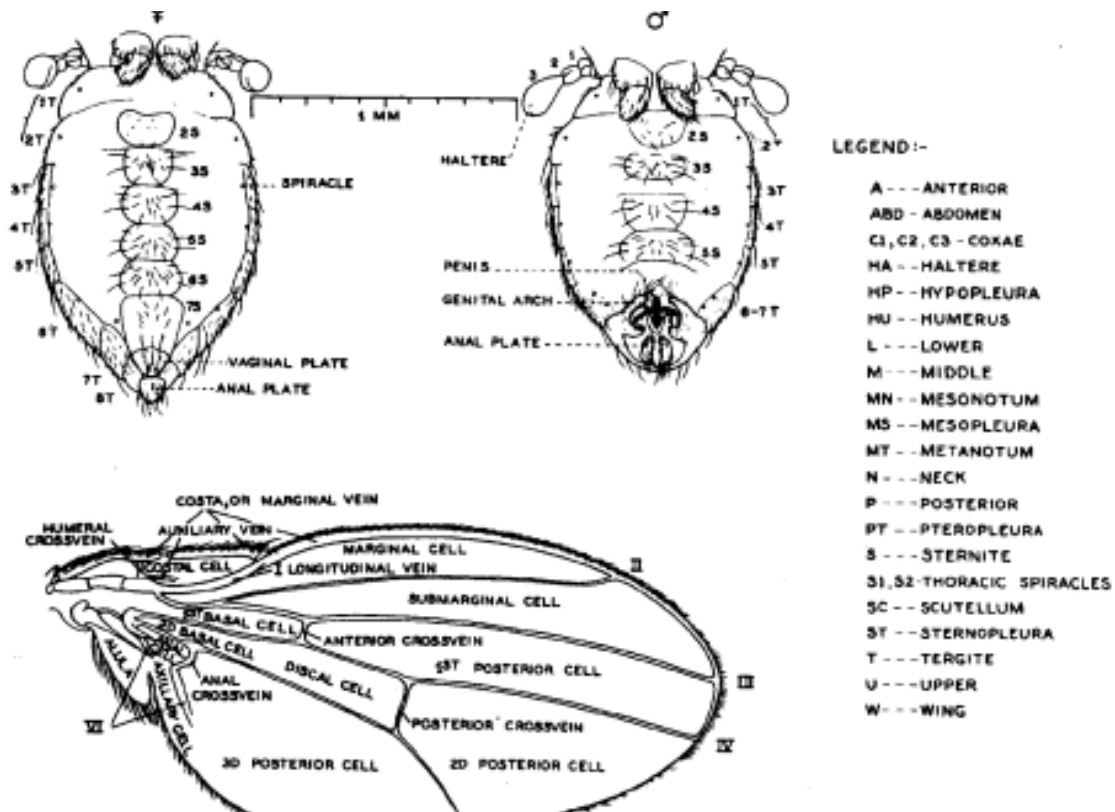
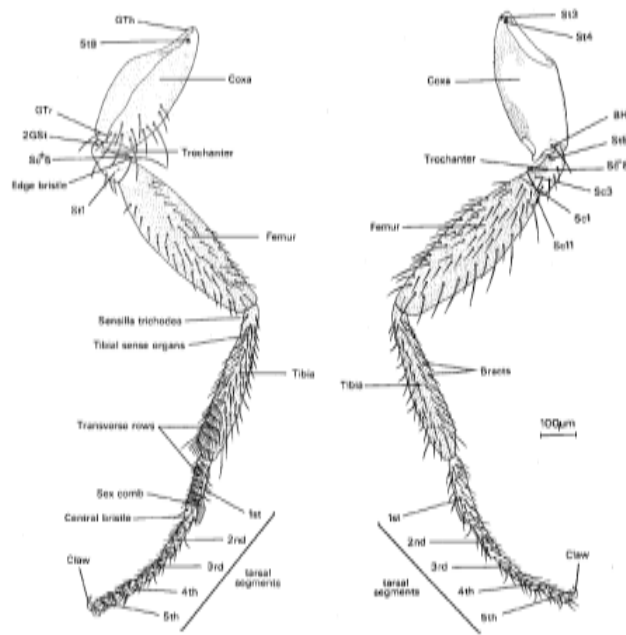
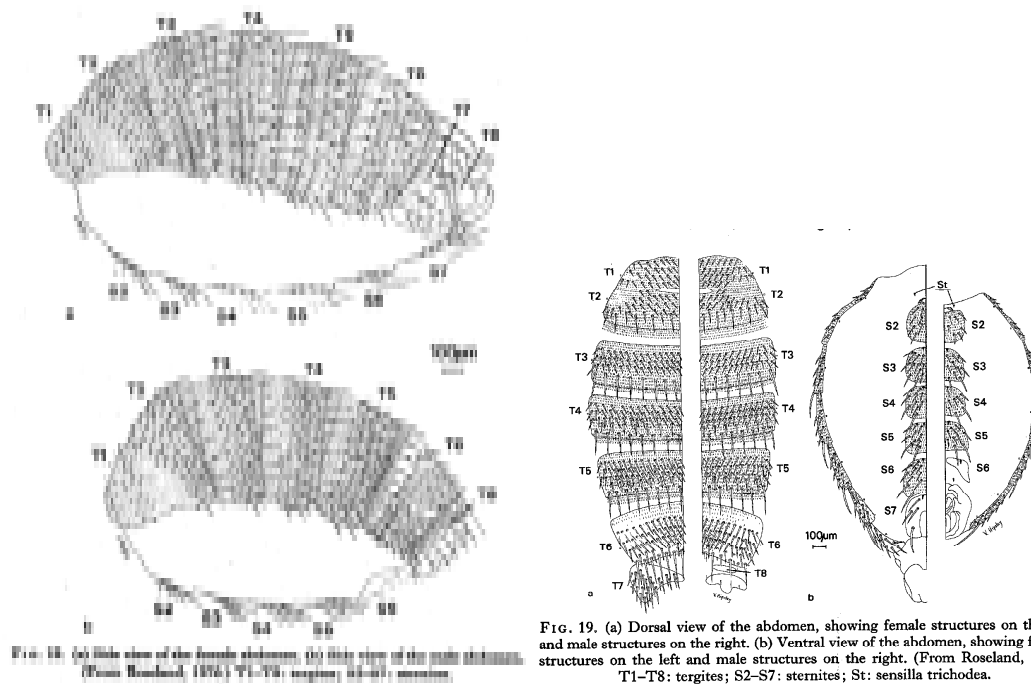


Abbildung 34: Abdomen und Flügel von *Drosophila*



**Abbildung 35: *Drosophila* Bein.** Mediale (links) und seitliche (rechts) Ansicht eines männlichen pro-torakalen Beins. Gth: Gelenk zwischen Coxa und Thorax. Gtr: Gelenk zwischen Coxa und Trochanter. St8, 2Gst, St1, St3, St4, St5: Gruppen von trichodealen Sensillen. Sc+5, Sc11, Sc1, Sc3, Sc-8: Gruppen von campaniformen Sensillen.



**FIG. 19. (a) Dorsal view of the abdomen, showing female structures on the left and male structures on the right. (b) Ventral view of the abdomen, showing female structures on the left and male structures on the right. (From Roseland, 1976.)**  
T1-T8: tergites; S2-S7: sternites; St: sensilla trichodea.

**Abbildung 36: Seiten-, dorsal und ventral Ansicht des Abdomens von *Drosophila***

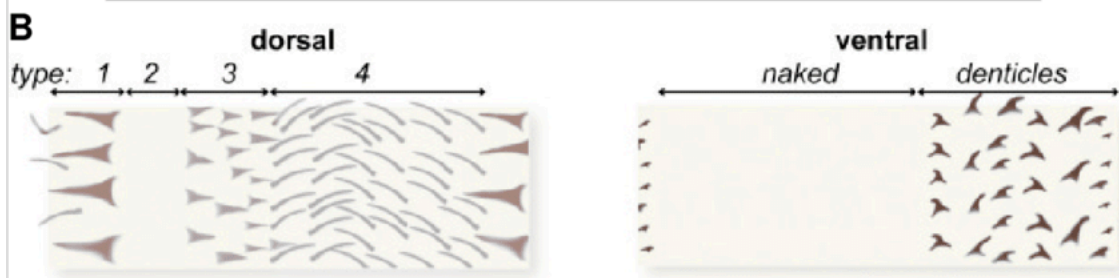
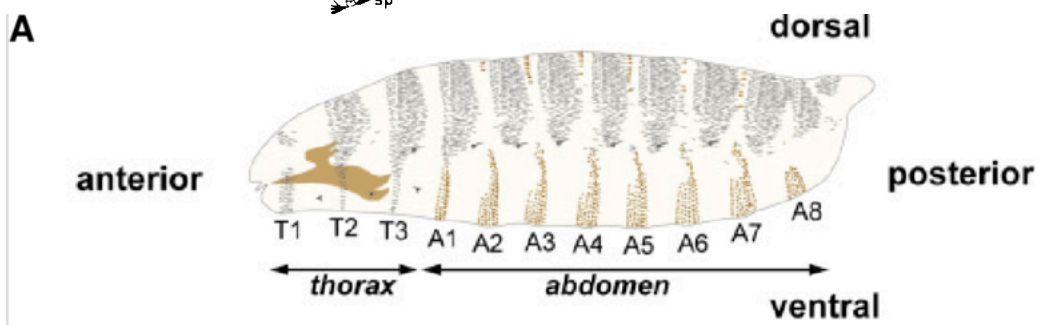
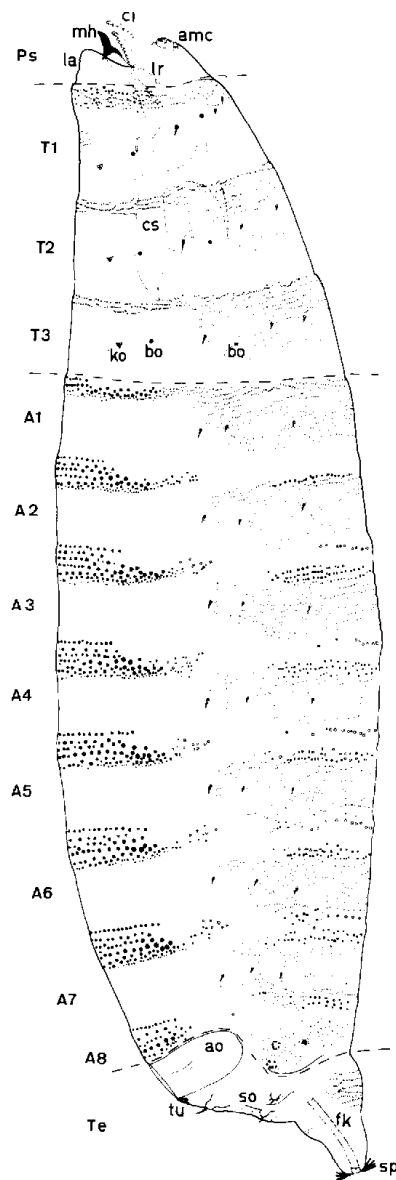
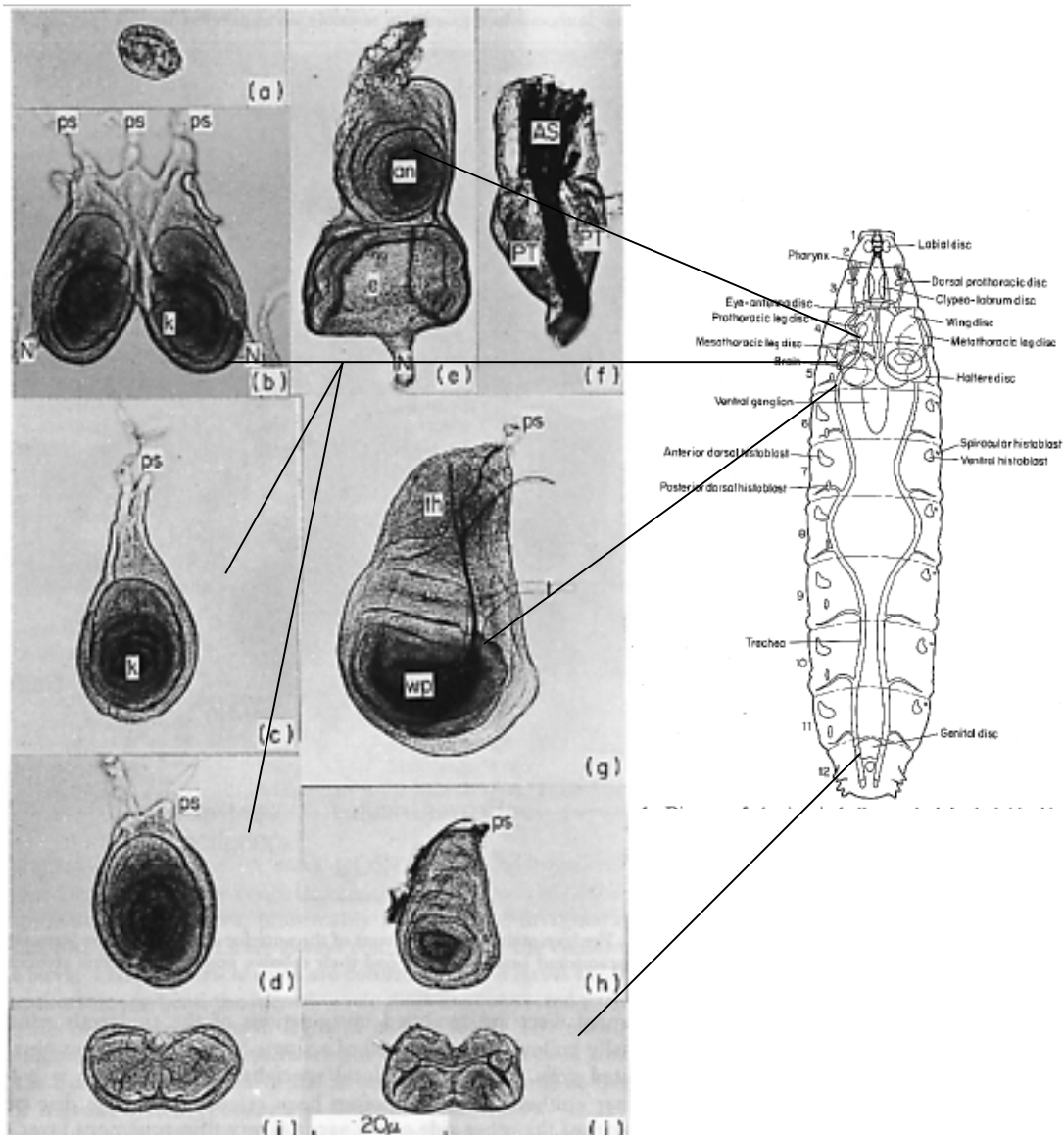


Abbildung 37: Larvale Segmente

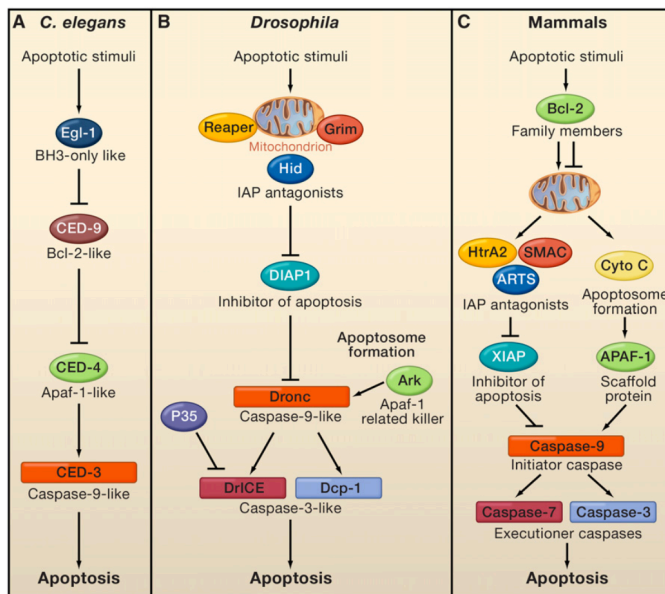
## Bildtafel Imaginalscheiben



**Abbildung 38: Imaginalscheiben aus Larven des dritten Larvenstadiums, im gleichen Maßstab dargestellt.** (a) Labialscheibe. (b) Prothoraxbeinscheibe (Paar). PS: Peripodialstil; N: Nerv zum ventralen Ganglion; K: "end knob". (c) Mesothoraxbeinscheibe. (d) Metathoraxbeinscheibe. (e) Augen-Antennenscheibe. an: Antennenanlage; e: Augenanlage; N: Nerv zum Gehirn. (f) Dorsale Prothoraxscheibe PT, um die Basis der anterioren Spirakeln, AS. (g) Flügelscheibe. wp: Anlage des Flügelblatts (wing pouch); th: Thoraxanlage; t: Trachee; ps: Peripodialstil. (h) Halterenscheibe. (i) Weibliche Genitalscheibe. (j) Männliche Genitalscheibe Die Imaginalscheiben sind paarig vorhanden (Ausnahme: die Genitalscheibe am posterioren Ende der Larve.)

## Experimente für Woche 1 und 2

In den ersten zwei Wochen werden wir zunächst mehrere Experimente mit einem Fokus auf Gliazellen durchführen. Zum einen werden wir die umhüllenden Gliazellen der peripheren Nerven charakterisieren. Hierzu werden wir die Zellen mit Hilfe von gerichteter GFP Expression markieren. Hierzu verwenden wir das binäre Gal4 / UAS System, dessen Aktivität wir mit Hilfe von Gal80 weiter eingrenzen. Nach Fixierung werden wir eine Antikörperfärbung durchführen und die Gliazellen im konfokalen Mikroskop aufnehmen. Im nächsten Schritt werden wir das Zelltod Gen *hid* exprimieren. Die Expression von Hid löst Apoptose aus und entsprechenden Tiere werden also keine entsprechenden Gliazellen mehr aufweisen {Fuchs:2011bb}. Dies werden wir über Immunfluoreszenz nachweisen (Antikörperfärbung gegen den Cut Transkriptionsfaktor).



Molekulare Kontrolle der Auslösung programmierten Zelltods in unterschiedlichen Organismen.

Das Fehlen der wrapping Gliazellen führt zu einem besonderen Bewegungsphänotyp der betroffenen Larven. Diesen Phänotyp werden wir mit Hilfe von FIMtrack und FIManalytics genauer beschreiben. FIMtrack ist ein von uns entwickeltes System zur Dokumentation von larvaler Bewegung. Es nutzt total interne Reflexion von Licht (Infrarot Licht) in einer Plexiglasplatte, um sehr spezifisch nur krabbelnde Larven zu beleuchten, die anschließend von einer Kamera mit einem Infrarot Filter aufgezeichnet werden können. Die Bewegung der Larve wird mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms analysiert und die Zahl der "coils" bestimmt. Coiling bezeichnet ein Verhalten in dem die Larve sich dermaßen krümmt, dass ihr Kopf bis an ihr Hinterteil reicht. Das Coiling wird nicht nur in Tieren gemessen, die keine wrapping Gliazellen haben, sondern auch in Kontrolltieren und in Tieren bei denen wir die Differenzierung der wrapping Glia in verschiedener Art und Weise stören.

Hierzu werden wir ein RNAi Experiment durchführen und dsRNA die gegen die folgenden Gene gerichtet ist spezifisch in den wrapping Gliazellen exprimieren: *cut*, *Notch*, *heartless*, *axotactin*, *uninflatable*. Bitte nutzen sie die FlyBase Website um nähere Informationen zu den jeweiligen Genen zu erhalten. Schließlich wollen wir eine abgewandelte GRASP Methode anwenden, um die Kontaktflächen von Gliazellen mit definierten Neuronen zu bestimmen. Wir verwenden die PDF Neurone, die eine Schlüsselfunktion bei der Kontrolle des circadianen Rhythmus bei Fliegen haben. In diesen Neuronen werden wir spezifisch einen Teil des GFP Proteins unter LexA Kontrolle exprimieren und den fehlenden Teil werden wir in



unterschiedlichen Gliazelltypen unter Gal4 Kontrolle exprimieren. Falls die beiden Proteindomänen in enger räumlicher Nähe exprimiert werden, können sie aggregieren und komplementieren. Hiermit ist die GFP Fluoreszenz wiederhergestellt. Bitte notieren sie sich die für diese Experimente notwendigen Kreuzungen.

### **Verwendete Drosophila Stämme**

nrv2-Gal4 / CyO<sup>Wee-P</sup>; 90C03-Gal80/(TM6)

UAS-hid /CyO

UAS-GFP/UAS-GFP; 90C03-Gal80/(TM6)

nrv2-Gal4 / CyO; 90C03-Gal80, UAS-mCherry/(TM6)

UAS-NotchdsRNA / UAS-NotchdsRNA

UAS-uifdsRNA / UAS-uifdsRNA

UAS-cutdsRNA / UAS-cutdsRNA

UAS-htlDN / UAS-htlDN

alrm-Gal4

55B12-Gal4

83E12-Gal4

Tret1-1-Gal4

Moody-Gal4

Pdf-LexA LexAOP-GFP<sup>1-10</sup>, UAS-GFP<sup>11</sup>

## Script for Circadian Clock experiments (Stanewsky lab)

### A) Temperature Compensation of the central clock (Astrid Giesecke)

Although *Drosophila melanogaster* can be synchronized by regularly fluctuating temperatures, the period length of the free-running rhythmicity is largely independent of the ambient temperature, i.e. circadian clocks are temperature compensated. How this compensation is achieved at the molecular level is not understood. In the course we will test a specific mutation within the key clock gene period for its effects on temperature compensation. We will focus on mutations in Nuclear export signals to test the hypothesis that temperature-dependent nuclear export and/or import of key clock proteins is important for temperature compensation. In addition, we will analyse different RNAi lines against nuclear export factors in combination with CRISPR knockouts of the same factors to further evaluate if nuclear export plays a role in temperature compensation in the *Drosophila* clock.

Lines/crosses to be tested

Stocks:

- y w
- per I530A; +; +

Crosses:

- y w; UAS dicer pdf-Gal4/CyO; + x y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01311}attP2 (Expresses dsRNA for RNAi of emb under UAS control)
- y w; UAS dicer tim-Gal4/CyO; + x y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01311}attP2 (Expresses dsRNA for RNAi of emb under UAS control)
- y w; UAS dicer pdf-Gal4/CyO; + x *Mtor*<sup>RNAi-1</sup> (Vienna *Drosophila* RNAi Center-VDRC) Transformant ID 110218 [v110218 (Expresses dsRNA for RNAi of emb under UAS control)
- y w; UAS dicer tim-Gal4/CyO; + x *Mtor*<sup>RNAi-1</sup> (Vienna *Drosophila* RNAi Center-VDRC) Transformant ID 110218 [v110218 (Expresses dsRNA for RNAi of emb under UAS control)
- y w; Clk856Gal4/CyO; Cas9/TM6 x y w; emb triple gRNA; +
- y w; TimGal4:27/CyO; Cas9/TM3 x y w; emb triple gRNA; +
- y w; Clk856Gal4/CyO; Cas9/TM6 x y w; meg triple gRNA; +
- y w; TimGal4:27/CyO; Cas9/TM3 x y w; meg triple gRNA; +

Male flies of these genotypes will be transferred individually to locomotor tubes and DAM monitors as described below. The DAM monitors will then be placed into incubators set to 18°C, 25°C, or 29°C in LD. After 3 days in LD, the incubators will be set to constant darkness (DD) to monitor the free running activity of the flies for 1 week.

After 1 week in DD, rhythmicity and period length of individual flies will be analysed with customized Matlab scripts (demonstration in course). Students will calculate the average period length for each genotype at each temperature and calculate the Q10 for each genotype.

### PROTOCOL FOR LOCOMOTOR ACTIVITY EXPERIMENTS

Preparation of the tubes:

The same tubes are used for circadian behaviour and sleep. The 66mm long tubes have to be filled with food and sealed with paraffin.

1. Put the tubes you need vertically in an appropriate size beaker (see table)

2. Bring the agar and sucrose (see table) to boil two or three times in a microwave until completely transparent
3. Fill the medium into the beaker either using a spoon touching the beaker or pouring it into the walls of the beaker, in order to avoid bubbles, until there is about 3 cm of food in all the vials. Move the vials in the beaker so that all of them get filled, and add more food if necessary
4. Cover with a cloth and wait until is set (they can be put at 4C)
5. Break loose the tubes with a spatula and clean the ends of the tubes
6. Cover the end of the vials with liquid paraffin

Beaker Size	Number of vials	ddH <sub>2</sub> O	Agar	Sucrose
1000ml	300	200ml	4g	8g
600ml	180	150ml	3g	6g
400ml	120	100ml	2g	4g
250ml	75	62.5ml	1.25g	2.5g

Loading the tubes:

1. Anesthetize flies on CO<sub>2</sub> and put single males into the prepared tubes.
2. Close the open end with cotton
3. Make sure that the flies wake up before putting them into the monitors

Loading the monitors:

The monitors to measure locomotion and sleep are called *Drosophila* Activity Monitors (DAMs) from Trikinetics (<http://www.trikinetics.com>), and they are based on breaking infrared light beams. Every time the fly crosses the infrared light, the monitor sends the information as one cross. We will use two different models (DAM-2 and DAM-IV, but the principle is same for both of them (Figure 1).

When loading the vials into the monitors make sure that the food doesn't block the infrared light beam going through the middle of each vial. Once the 32 vials of a monitor are loaded, secure them with a rubber band (only if you are using DAM-2).

Plug the monitors using the provided cables, and use splitters if necessary. Do not put loose ends of cables into water.

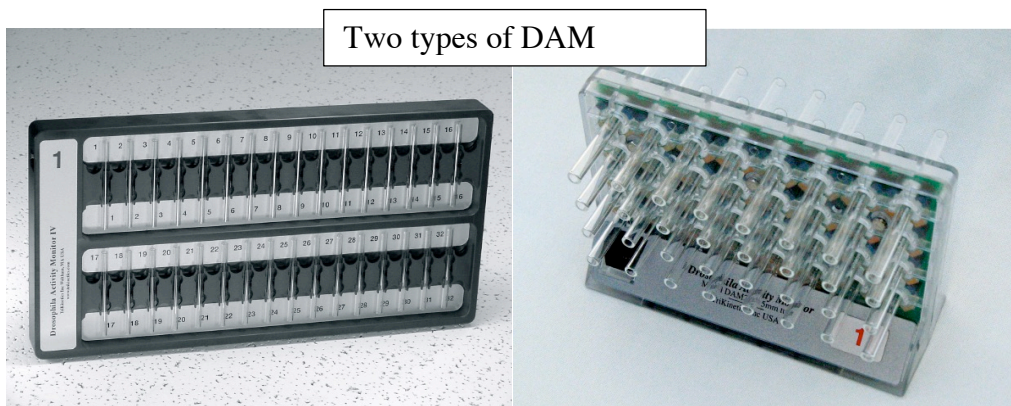


Figure 1: DAM-IV

DAM-2

#### Reference:

Singh S, Giesecke A, Damulewicz M, Fexova S, Mazzotta GM, Stanewsky R, Dolezel D. New *Drosophila* Circadian Clock Mutants Affecting Temperature Compensation Induced by Targeted Mutagenesis of *Timeless*. *Front Physiol.* 2019 Dec 3; 10:1442. doi: 10.3389/fphys.2019.01442.

## B) Temperature compensation of peripheral clocks (Rebekah George)

The temperature-independent period length of *Drosophila*'s activity and eclosion rhythms show that the clock operating in the brain neurons controlling these behaviours must be temperature compensated. But is this true also for peripheral clock tissues? Almost all cells of the fly (and of mammals) contain a circadian oscillator although the function of the clock in these cells and tissues is largely unknown. Since circadian oscillators are temperature compensated by definition, peripheral clocks are expected to be temperature compensated as well. But is this really the case? To address this question, we will dissect the halteres of *Drosophila*, structures that are important for the flies balance during flight and for proprioception. The flies we use for dissection express the clock protein **Timeless (Tim)** fused to the reporter protein **Luciferase (Luc)** (*ptim-TIM-LUC* flies) (Figure 2). Because the Tim protein is expressed rhythmically, Luc is also rhythmic, and by adding Luciferin (the substrate for Luciferase) to the food or medium, we can measure gene expression in real time by recording the bioluminescence emanating from the halteres.

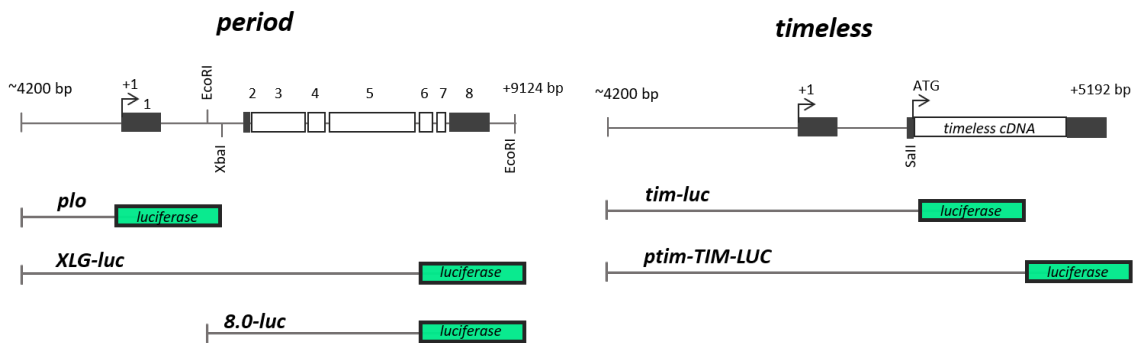
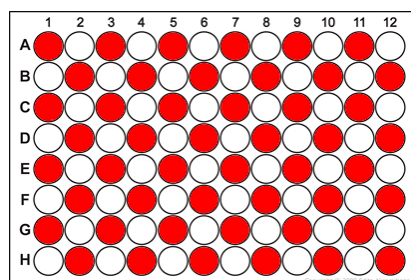


Figure 2: Constructs and transgenic flies to measure clock gene expression

### Preparation of the tissue *TIM-LUC flies*

1. Prepare sterile filtrated culture medium (already prepared)
  - a. 80 % Schneider's Medium 20
  - b. 20 % Fetal Bovine serum
  - c. 1 % Penstrep
2. For one plate, you need:
  - a. 10 ml culture medium
  - b. 226  $\mu$ M luciferin (20  $\mu$ l luciferin in 10 ml medium)
3. Add 200  $\mu$ l per well with a pipette as follows:  
Fill 48 wells of the 96 well plate in an alternating manner starting from A1 (meaning fill A1, C1, E1, G1, then: B2,D2, F2, H2 etc.)



4. Sedate the flies on ice

5. Perform bilateral "dry" dissections of the halteres, meaning that the tissue dissections are not performed in a buffer. Tip: Squeeze the thorax with your left forceps so you can access the halteres with your right forceps.
6. Put both halteres in each well containing culture media + luciferin
7. Remember to mark the loading sheets accordingly
8. When the plate is done, cover the plate with the TopCount sealing foil.
9. Use a razor blade to remove the foil extending from the bottom corner of the plate.

### **Measuring bioluminescence**

To measure the bioluminescence of the fly parts throughout the day for a week, we use two automated Packard TopCount plate readers located in incubators allowing Light-Dark (LD) and temperature control. Two incubators will be set to 18°C and 29°C in LD, respectively. After 2 days in LD, the incubators will be set to constant darkness (DD) to monitor the free running activity of the flies for 1 week at both 18°C and 29°C.

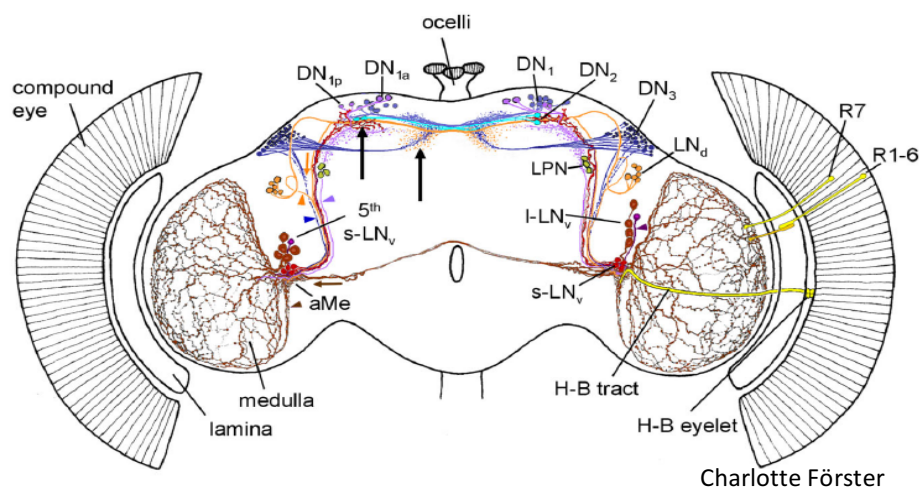
After 1 week in DD, rhythmicity and period length of individual wells will be plotted and analysed with customized rhythms analysis software (BRASS and ChronoStar: demonstration in course). Students will calculate the average period length & Q10 for each genotype and tissue at each temperature.

### **Reference:**

Versteven M, Ernst KM, Stanewsky R. A Robust and Self-Sustained Peripheral Circadian Oscillator Reveals Differences in Temperature Compensation Properties with Central Brain Clocks. *iScience*. 2020 Aug 21;23(8):101388. doi: 10.1016/j.isci.2020.101388.

### **C) Direct effects of temperature on behavioral activity patterns (Angelique Lamaze)**

While the clock is temperature compensated, we can still observe a change of the phase of a clock-controlled behaviour at different temperature level. In LD constant 25°C, male flies present two increases of locomotion before light-transitions. Hence, we define them as anticipatory activities, as they synchronously increase their movement "anticipating" light changes. Although controlled by the circadian clock these two locomotor outputs respond in opposite manner to temperature changes. At 18°C, flies stop anticipating light-on while the evening activity advances to the afternoon. At warmer temperature (>25°C) the amplitude of the morning activity increases and the phase advances into the late night, while the evening activity delays into the early night at temperatures above 30°C.



By definition, sleep can be measured as an absence of movement of at least 5 minutes. *Drosophila* males sleep during both day and night in LD condition. These two phases of sleep are differently regulated. Day sleep, also called siesta, is controlled by both the circadian clock and the environment.

The brain clock is composed of about 150 clock neurons primarily differentiated by their anatomical position (Figure 3). The small clock neurons in the ventro-lateral area of the brain, the sLN<sub>v</sub>, that express the neuropeptide PDF (Pigment Dispersing Factor), and the dorsal neurons in the posterior area of the protocerebrum, the DN1<sub>p</sub>, control the morning anticipation. In the absence of PDF or in the absence of neuronal activity from the DN1<sub>p</sub>, flies are incapable of anticipating lights-on.

Figure 3: Fly brain with clock neurons and their projections

Here, we are going to test the role of the DN1<sub>p</sub> in phasing the siesta to warm temperature (>30°C).

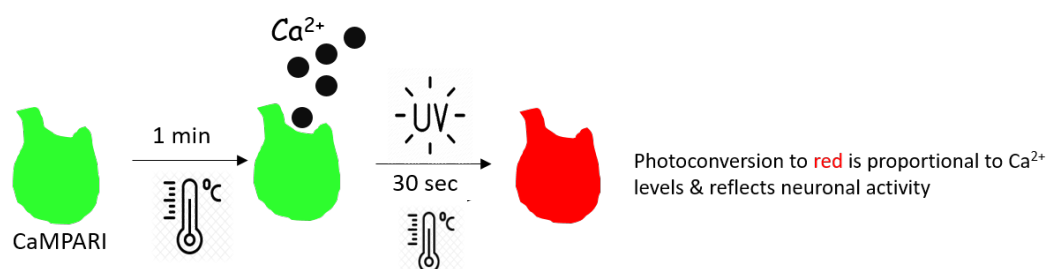
Using the DAM monitors (see A, Figure 1) we will compare the siesta at 22°C with the siesta at 31°C in control flies, clock mutant flies, and flies in which DN1<sub>p</sub> neuronal activity is inhibited. Using a Ca<sup>2+</sup> indicator (CaMPARI system), we will compare DN1<sub>p</sub> neuronal activity in the morning and the end of the afternoon and at 22°C and 31°C.

Using the results of these experiments, we will discuss the role of these clock neurons in controlling locomotor behaviour with temperature.

### Calcium imaging (CaMPARI Experiments)

Genetically encoded calcium indicators are useful for measuring neuronal activity. CaMPARI (Calcium Modulated Photoactivatable Ratiometric Integrator) is one such tool. It is a photo-convertible fluorescent protein that changes from green to red when intracellular calcium levels rise. For colour conversion to occur, tissues need to be exposed to photo-conversion light (i.e. UV at ~380nm). Unlike most other calcium indicators that report calcium levels in a more transient manner, CaMPARI ‘locks in’ any calcium rise during stimulation by irreversibly marking active neurons red. The intensity of red fluorescence visualized is therefore directly proportional to calcium levels and reflects neuronal activity.

Today, we will use CaMPARI to understand how the DN1<sub>p</sub> behave under different temperatures and time of day. On a Peltier – a thermoelectric heat pump, anesthetized male flies will be subjected to 1 minute of heating from room temperature to 31°C before a 30 second-long UV pulse is applied to induce photoconversion (Figure 4). As controls, we will UV-pulse flies without subjecting them to any temperature change. After this treatment, brains will be dissected in haemolymph-like (HL-3) buffer to maintain osmolarity and keep the tissues alive during dissection and confocal imaging.





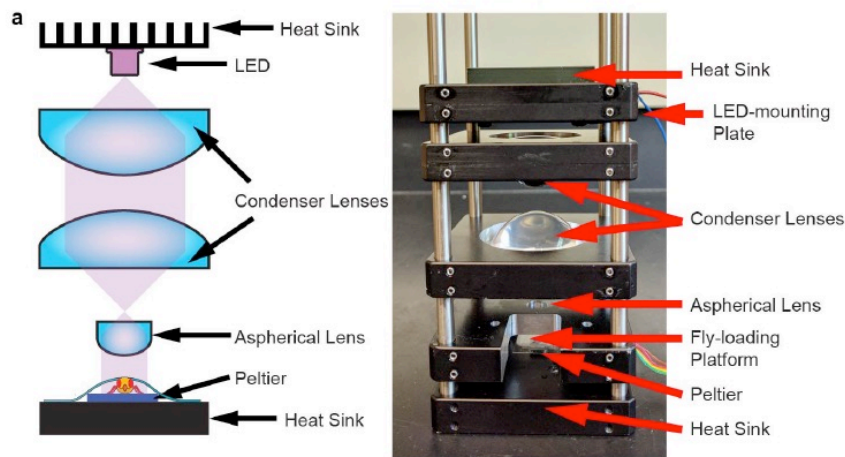


Figure 4: Scheme of CaMPARI principle and Photoconversion/Peltier device

Flies used for the experiments:

Clk4.1M-Gal4: the Gal4 is expressed specifically in about 8 DN1p

UAS-TNTG: The tetanus toxin blocks the exocytosis of synaptic vesicles, hence ending the neuronal activity of the neurons that express it.

UAS-CaMPARI: CaMPARI encodes for a  $\text{Ca}^{2+}$  indicator. It switches from green to red in presence of high level of intra cellular calcium and UV light.

*tim<sup>KO</sup>*: a mini *white* gene replaced the timeless locus. Homozygous flies does not have a functional clock anymore.

Iso31: isogenic white eye flies

Crosses:

Clk4.1M-Gal4 x iso31

Clk4.1M-Gal4 x UAS-TNTG

UAS-TNTG x iso31

Clk4.1M x CaMPARI

#### References:

Lamaze A, Öztürk-Çolak A, Fischer R, Peschel N, Koh K, Jepson JE. Regulation of sleep plasticity by a thermosensitive circuit in *Drosophila*. *Sci Rep*. 2017 Jan 13;7:40304. doi: 10.1038/srep40304.

Lamaze A, Krätschmer P, Chen KF, Lowe S, Jepson JEC. A Wake-Promoting Circadian Output Circuit in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2018 Oct 8;28(19):3098-3105.e3. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.024.

#### D) Rhythmic locomotor behavior under constant light (Katharina Eick)

One of the major *Zeitgebers* entraining the circadian clock of *Drosophila* are light dark (LD) cycles. In the absence of this environmental cue, in constant darkness (DD), flies can maintain a self-sustained rhythm. In contrast, in constant light (LL) wild type flies become arrhythmic, as the core clock protein Timeless gets constantly degraded which continuously resets the clock. Therefore, behavior experiments under LL conditions can be used to identify proteins that are involved in light-input to the circadian clock. RNAi knockdown of the membrane-anchored *Zona Pellucida* domain protein Quasimodo (QSM) leads to a high percentage of rhythmic flies under constant dim light conditions (LL<sub>dim</sub>). Concordantly, RNAi knockdown of the cation chloride cotransporter NKCC, which is hypothesized to interact with QSM, results in the same phenotype in LL<sub>dim</sub>.

In the course we will use RNAi to knock down KCC, another member of the cation chloride cotransporter family, in different subsets of clock neurons and test these flies in LL<sub>dim</sub>.

Male flies of the indicated genotypes will be selected, loaded into locomotor behavior tubes, and then placed into *Drosophila Activity Monitors* (DAMs) (see **A**, Figure 1). The monitors will be placed into an incubator set to the following conditions: 12h:12h LD at 25°C for 3 days, LL<sub>dim</sub> ( $\approx 15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) at 25°C for 7 days. Afterwards the behavior will be analyzed using MatLab and the percentage of rhythmic flies will be determined for each genotype.

tim27 Gal4 > UAS kcc<sup>RNAi</sup>  
 repo Gal4 > UAS kcc<sup>RNAi</sup>  
 qsm104 Gal4 > UAS kcc<sup>RNAi</sup>  
 Gal4 11.18 > UAS kcc<sup>RNAi</sup>  
 KCC-Trojan Gal4 > UAS kcc<sup>RNAi</sup>  
 tim27 Gal4 / +  
 repo Gal4 / +  
 qsm104 Gal4 / +  
 Gal4 11.18 / +  
 KCC-Trojan Gal4 / +  
 UAS kcc<sup>RNAi</sup> / +

## References

Chen K.F., Peschel N., Zavodska R., Sehadova H., Stanewsky R. (2011) Quasimodo, a Novel GPI-anchored zona pellucida protein involved in light input to the *Drosophila* circadian clock, *Current biology*, 21/9: 719–29.  
 Buhl E., Bradlaugh A., Ogueta M., Chen K.-F., Stanewsky R., Hodge J.J.L. (2016) Quasimodo mediates daily and acute light effects on *Drosophila* clock neuron excitability, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113/47: 13486–91.

## **E: Day/night changes of clock protein expression in central brain clock neurons (Maite Ogueta)**

The rhythmic behaviour of the flies reflects the negative feedback loop that occurs in all clock neurons in the brain (Figure 3). To study the molecular clock of the fly, one common experiment is to perform immunofluorescent studies with antibodies against the main components of the clock (PER or TIM for example). We will study PER/TIM expression in a light:dark cycle at 25°C, and perform brain dissections at a light time point and a dark time point. We will also check the molecular clock in constant darkness and in constant light, to test if clock protein oscillations are correlated with behaviour.

Genotype: Canton S

Time points: ZT10 and ZT22

Method:

- Fix the flies for 2h30min in 4% PFA in 0,1% PBST (PBS with Triton X100)
- Wash 3x 5min and 3x 15min with 0,1% PBST
- Put the flies on PBS and proceed with the dissection (the dissection can be delayed up to 48h, if the flies are kept at 4 degrees)
- Collect the brains in PBS with a drop of 0,5% PBST
- Exchange the solution with the blocking solution (5% Goat Serum in 0,5% PBST). Leave rotating for 2h at room temperature
- Incubate with the primary antibodies overnight at 4 degrees
  - anti-Per 1:10000
  - anti-PDF 1:500
  - Dilute in 5% GS in 0,5% PBST
- Wash 3x 5min and 3x 15min with 0,5% PBST



- Incubate with the secondary antibody for 2h at room temperature (depending on the time, can also be overnight at 4 degrees), covered with aluminium foil
- Wash 3x 5min and 3x 15min with 0,5% PBST
- Mount using Vectashield and store at 4 degrees

**Reference:**

Ogueta M, Hardie RC, Stanewsky R. Light Sampling via Throttled Visual Phototransduction Robustly Synchronizes the *Drosophila* Circadian Clock. *Curr Biol*. 2020 Jul 6;30(13):2551-2563.e3. doi: 10.1016/j.cub.2020.04.067