



Georg-August-Universität
Göttingen

Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut
für Zoologie und Anthropologie
Entwicklungsbiologie

Grundpraktikum

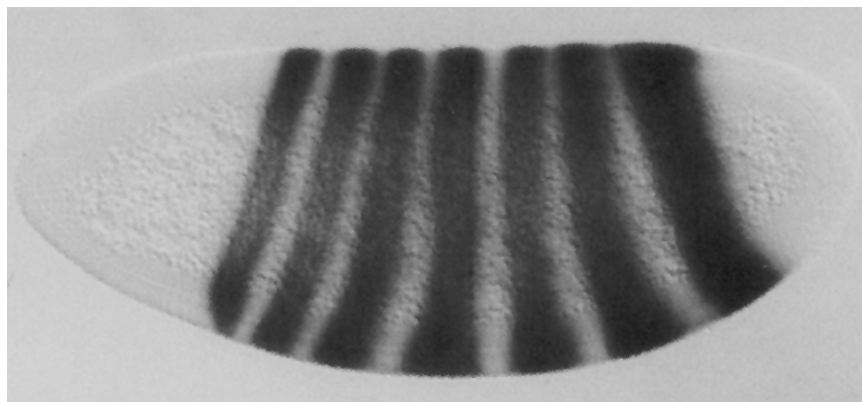
Entwicklungs- und Zellbiologie

63211

Wintersemester 2008/2009

Praktikumsteil

Entwicklungsbiologie der Tiere



Inhaltsverzeichnis und Versuchsübersicht

Versuch A:

1. Gewebsfixierung bei *Drosophila melanogaster* und *Tribolium castaneum* S. 1

2. Histologische Färbung: Alkoholische Fuchsinfärbung S. 4

Vergleich der Embryonalanlage und des Segmentierungsmodus von Käfer und Fliegenembryonen.

Versuch B:

3. Lebendbeobachtung der Entwicklung von Fliegen- und Froschembryonen S. 8

Beobachtung der Entwicklung von Fliegen- und Froschembryonen und Bestimmung der Entwicklungszeit verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung.

Versuch C:

4. Kutikulapräparationen zur Analyse von Entwicklungsmutanten S. 14

*Auswirkungen von Entwicklungsmutanten auf die Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* und Zuordnung der Phänotypen zu maternalen und zygotischen Segmentierungs-Genklassen.*

Versuch D:

5. Nachweis der *lacZ*-Reporter-gen-Expression mittels X-Gal-Färbung S. 21

Transgen gesteuerte Miss-Expression des LacZ Reportergens über das binäre UAS/Gal4 Miss-Expressionssystem. Detektion der LacZ Expression durch die β -Galactosidase-Aktivitätsfärbung (X-Gal-Färbung). Identifikation von neuen "Enhancer Traps", die durch in einer Transposon-Mutagenese gefunden wurden.

Anhang

6. Entwicklungsstadien bei *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* und *Xenopus laevis*, Schemata innerer Organe in *Drosophila* Embryonen S. 28

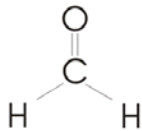
Versuchsplan

Montag 9:00 – 18:00h	Dienstag Kursteil in der Botanik	Mittwoch 9:00 – 18:00h	Donnerstag 14:00 – 18:00h	Freitag 9:00 – 18:00h
Theoretischer Teil				
<ul style="list-style-type: none"> - Sicherheitsbelehrung - Methoden - Entwicklungsgene - GAL4/AUS System 	—	<ul style="list-style-type: none"> - Lebendbeobachtung - histologische Färbungen 	<ul style="list-style-type: none"> - Auswertung A und C 	<ul style="list-style-type: none"> - Auswertung B und D - Enhancer Trap Screen
Praktischer Teil				
<p>Versuch A:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kollektion & Fixierung - Fuchsin-Färbung <p>Versuch C:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kreuzung: zygotische Mutanten - Kreuzung: maternale Effektmutanten <p>Versuch D:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kreuzung GAL4/UAS 	<p><i>von den Betreuern durchgeführt:</i></p> <p>Versuch C:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Plattenwechsel</i> 	<p>Versuch B:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lebendbeobachtung <p>Versuch A:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vergleich der Präparate <p>Versuch C:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kutikulapräparation <p>Versuch D:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Plattenwechsel 	<p>Versuch D:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Plattenwechsel <p>Versuch B:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lebendbeobachtung <p>Versuch C:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Auswertung der Kutikulapräparate 	<p>Versuch D:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kollektion & Fixierung - X-Gal-Färbung <p>Versuch B:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lebendbeobachtung

Versuch A Gewebefixierung bei *Drosophila melanogaster* und *Tribolium castaneum*

1.1. Einleitung

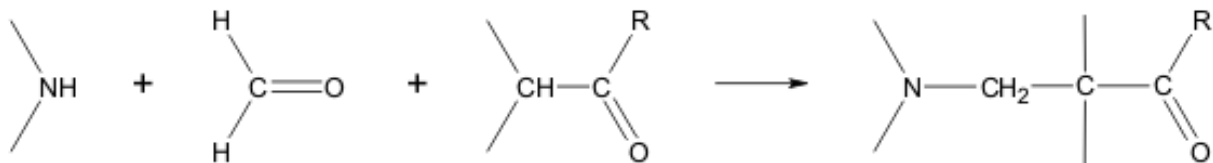
Um die zelluläre Morphologie bestimmter Entwicklungsstadien zu konservieren, wird das Gewebe der Präparate durch Quervernetzung von Makromolekülen fixiert. Als Fixativ wird dabei oft **Formaldehyd** verwendet.



Formaldehyd
T (giftig)

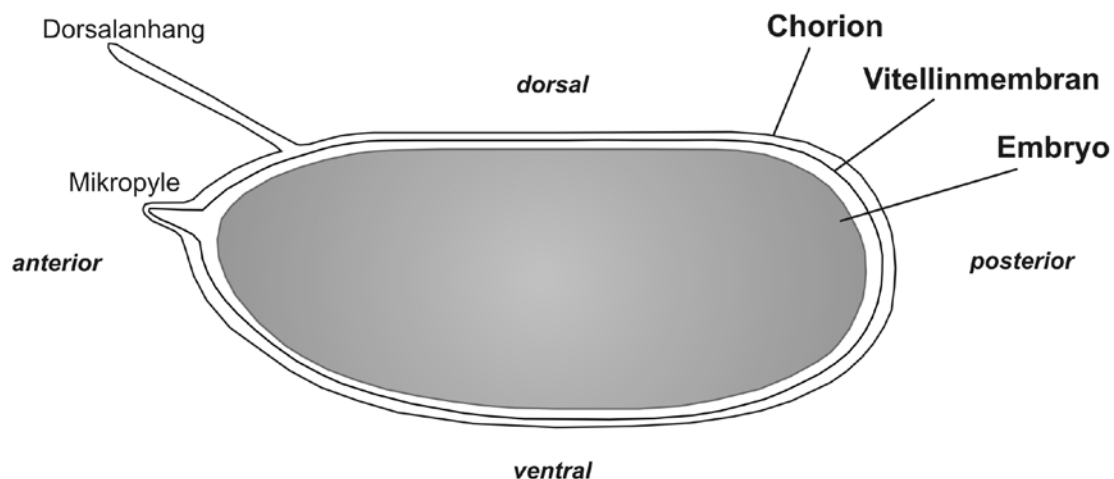
Zur Konservierung von anatomischen und biologischen Präparaten wird es als 37%ige wässrige Lösung (Formalin) verwendet.

Im Labor wird Formaldehyd zur Fixierung des Gewebes nach der Mannich-Reaktion eingesetzt, bei der eine Aminoalkylierung von α -CH-aciden Verbindungen mit Formaldehyd und einem primären oder sekundären Amin stattfindet. Es entstehen β -Aminocarbonylverbindungen (Mannich-Basen).



Um dem Fixativ Zugang zu den Embryonalgeweben zu ermöglichen, wird zunächst die äußere Eihülle, das Chorion durch Wasschen in Natriumhypochlorit („Klorix“), entfernt. Dabei wird der Embryo durch die Vitellinmembran geschützt. Da die Vitellinmembran der Insekteneier für das wasserbasierte Fixativ undurchlässig ist, wird die Fixierung unter Schütteln mit Heptan durchgeführt. Dadurch wird die Vitellinmembran für das Fixativ durchlässig.

Um nach der Fixierung größeren Molekülen wie Antikörpern oder RNA-Proben den Zugang zu den Embryonalgeweben zu ermöglichen, muss durch osmotischen Schock durch MeOH Zugabe die Vitellinmembran aufgebrochen und entfernt werden.



Diese Abbildung verdeutlicht den schematischen Aufbau eines *Drosophila*-Embryos.

1.2. Gewinnung von *Drosophila melanogaster* – Embryonen

- Sie erhalten halbe Apfelagarsaft-Platten, auf die Fliegen über Nacht Eier abgelegt haben.
- Embryonen (**möglichst viele**) werden von den Apfelsaftagarplatten mit einem Pinsel in ein Siebchen transferiert und mit dH₂O gespült. Die Platte hierfür mit viel Wasser einweichen; so lösen sich die Embryonen gut ab und können vorsichtig ins Sieb gespült werden
- unter dem Binokular die Dorsalanhänge ansehen, damit später entschieden werden kann, ob sie erfolgreich entfernt wurden

1.3. Gewinnung von *Tribolium castaneum* – Embryonen

- Käfer-Embryonen werden durch ein Sieb vom Mehl getrennt (Demonstration durch Betreuer)
- Kleine Portionen von Käfer-Embryonen werden in jeweils ein Netzchen ausgeteilt
- Mit dH₂O-Spritzflasche so viel Mehl wie möglich durch das Sieb waschen

1.4. Fixierung von Käfer- und Fliegen - Embryonen

Dechorionisierung

- Embryonen für 5 min im Sieb in einer Petrischale mit 50% Klorix inkubieren. Das Sieb dabei vorsichtig in der Flüssigkeit bewegen (bei *Tribolium* kann so das restliche Mehl entfernt werden)
(Achtung: Kittel, Handschuhe! Klorix ist ein starkes Bleichmittel.
Aufpassen, dass keine Spritzer in Augen oder auf Kleider gelangen!)
- Waschen mit dH₂O-Spritzflasche
- am Stereomikroskop kontrollieren:
 - ob bei den *Tribolium*-Embryonen alles Mehl (jetzt gequollen und transparent) entfernt ist.
 - ob bei den *Drosophila*-Embryonen das Chorion (Dorsalanhänge) komplett aufgelöst wurde (Embryonen glänzen)
- nur wenn dies nicht der Fall ist erneut für wenige Minuten in Klorix inkubieren, waschen und kontrollieren



Klorix
Xi (reizend)

Fixierung

- Transferieren Sie die Embryonen mit Hilfe eines Pinsels in ein Szintillationsgefäß mit Heptan-Fixierungspuffer-Gemisch:
 - 2 ml F-Embryo-Fix (PEMS)
 - 5 ml Heptan
- **300 µl** 37% Formaldehyd (=Fixativ) zugeben
- Dann Embryonen für **30 min fixieren** lassen (auf Schüttler)
- Siebchen sofort gründlich säubern (die Siebe können aufgedreht werden)



Heptan
F (leichtentzündlich)



Formaldehyd
T (giftig)

Devitellinisierung

- Entfernen Sie mit einer Pasteurpipette die untere (wässrige) Phase (die Embryonen bleiben zurück; Fixativ zum "Organische Lösungsmittel"-Abfall geben)

- Geben Sie zügig jeweils **8ml Methanol** zu (große Spenderflaschen befinden sich im Abzug), verschließen Sie das Gefäß gut und schütteln Sie kräftig für ca. 30 sek. (alternativ können die Embryonen gevortext werden)



Methanol

F (leichtentzündlich)



T (giftig)

Die Vitellinmembranen platzen bei dieser Behandlung osmotisch auf, lösen sich aber nur zum Teil von den Embryonen, welche deshalb in der Interphase zurückbleiben.

- Entfernen Sie den größten Teil der Heptanphase (oben; "Organische Lösungsmittel"-Abfall)
- Geben Sie so viel Methanol zu, bis alle Embryonen abgesunken sind
- Transferieren Sie die Embryonen mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorf-Gefäß
- Szintillationgefäße gründlich säubern und 'offen' trocknen lassen
- Waschen Sie die Embryonen je 3x mit je 1ml Methanol, um Heptanreste auszuwaschen (im letzten Waschschrift wird das Methanol nicht wieder abgenommen)
- Die Embryonen werden im Methanol aufbewahrt und am Nachmittag für die Fuchsinfärbung weiterverwendet

[F-Embryo-Fix
(aufbewahrt bei 4°C)

PEMS-Puffer:
12,08 g Pipes
800 µl 1 M MgSO₄
800 µl 0,5 M EDTA
mit NaOH auf pH 6.9 einstellen,
mit Millipore-H₂O auf 400 ml auffüllen]

Versuch A Histologische Färbung: Alkoholische Fuchsinfärbung

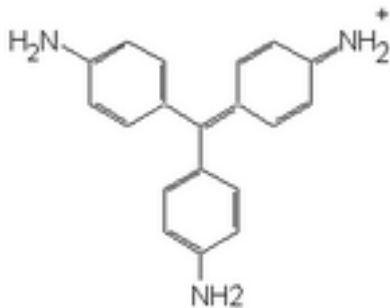
2.1. Einleitung

Bei einer histologischen Färbung wird ein Farbstoff in Lösung angeboten, der an definierte Gewebestrukturen bindet. Dies dient der Kontrasterhöhung und erlaubt eine deutlichere Erkennung der Gewebestrukturen im Vergleich zu ungefärbten Präparaten.

Fuchsin ist ein roter Triphenylmethan-Farbstoff, der in Alkohol (Ethanol) gelöst in der Mikroskopie und Histologie zum Färben verwendet wird. Fuchsin wird in der Feulgenschen Nuclealreaktion eingesetzt, um DNA in Zellkernen nachzuweisen. Fuchsin wurde 1858 von dem deutschen Chemiker August Wilhelm von Hofmann und fast zur gleichen Zeit von dem Lyoner Chemiker Verguin entdeckt und nach der amerikanischen Zierpflanze Fuchsia benannt, deren blaurote Blüten einen ähnlichen Farbton aufweisen.

Fuchsin bindet an DNA, deren Purin-Basen durch milde Säure-Behandlung abgespalten wurden.

Fuchsin:



Fuchsin

Xn
(gesundheitsschädlich)

Die Ladung und die Doppelbindungen sind über das gesamte Molekül verteilt, diese Resonanzformen begründen die intensive Farbigkeit des Fuchsin (es ist tief rot).

2.2. Alkoholische Fuchsinfärbung von Insekten-Embryonen

- alle Schritte in **Eppendorf-Gefäßen**
- längere Inkubationen (mit Zeitangaben) auf dem **Drehrad**
- wenn nicht anders angegeben, wird **je 1 ml Lösung** pipettiert
- zum Pipettieren von **Fuchsin**-haltigen Lösungen bitte **Plastik- oder Pasteurpipetten** verwenden
(Fuchsin färbt sehr stark – die teuren Pipetten sollen geschont werden!)
- **Handschuhe!**

- Embryonen 1 h in Lösung A nachfixieren (auf Drehrad)
- Lösung A abnehmen
- 4 x 10 min in 70%igem EtOH waschen
- Ethanol durch HCl austauschen
10 min in den Heizblock bei 65°
(**kritischer Schritt**: genau einhalten!)



Salzsäure

C (ätzend)

- 1 x mit dH₂O waschen
- 2 x mit 70%igem EtOH waschen
- Überstand abnehmen
- 500 µl alkoholische Fuchsinlösung dazugeben und **30 min** (nicht länger!) färben lassen

Wichtig – für die folgenden Schritte gilt:

Die Embryonen sind in der Fuchsinlösung nicht oder nur sehr schlecht zu sehen!
Daher die Embryonen jeweils mindestens 3 Minuten absinken lassen, bevor Flüssigkeit abgenommen wird. Wenn die Embryonen sichtbar werden nach Sichtkontrolle abnehmen.

- 500 µl 70% EtOH zugeben
- Die oberen 500 µl vorsichtig abnehmen und 500µl 100% EtOH zugeben
- Solange entfärben mit 100% EtOH, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird
- Dann in PBT überführen: Hälfte des Überstands abnehmen und mit 500µl PBT aufwirbeln
- 500µl abnehmen und weitere 500µl PBT zugeben
- Überstand abnehmen, 1 ml PBT zugeben, 2/3 des Überstandes wieder abnehmen.
- Embryonen in möglichst wenig Flüssigkeit mit Hilfe einer abgeschnittenen blauen Spitze oder Plastikpipette aufnehmen und in der Pipettenspitze kurz absinken lassen, mit möglichst wenig Flüssigkeit auf Objektträger tropfen.
- Auf Objektträger in 100 µl Glycerin (100%) einbetten
- Deckgläschen (24 x 40 mm; für *Tribolium* mit kleinen Plastillinfüßchen an den Ecken) auflegen
- Deckgläschen mit Nagellack an den Rändern versiegeln – trocknen lassen!
- Unter dem Mikroskop im Hellfeld analysieren

[Lösung A: 4,0 ml 95%igen EtOH
 0,5 ml 100%ige Essigsäure
 0,2 ml 37%igen Formaldehyd

Alkoholische Fuchsinlösung:

100 mg Pararosanilin (Sigma P-7632)
16 ml EtOH
4 ml ddH₂O
0,2 ml konzentrierte HCl
bei -20°C einfrieren

PBS: 140 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄

PBT: PBS + 0,1% Tween 20]

2.3. Aufgabenstellung zu Experiment A

Im Anhang des Skriptes befinden sich Tafeln mit Entwicklungsstadien von Taufliege und Mehlkäfer (6.2: *Entwicklungsstadien Drosophila melanogaster* und 6.1: *Entwicklungsstadien Tribolium castaneum*).

Versuchen Sie, die unten stehenden Fragen mithilfe dieser Abbildungen zu beantworten!

Tribolium castaneum

Versuchen Sie, die auf Seite 28 abgebildeten Stadien wiederzufinden! Versuchen Sie dabei jeweils, die folgenden Strukturen in Ihren Präparaten zu erkennen:

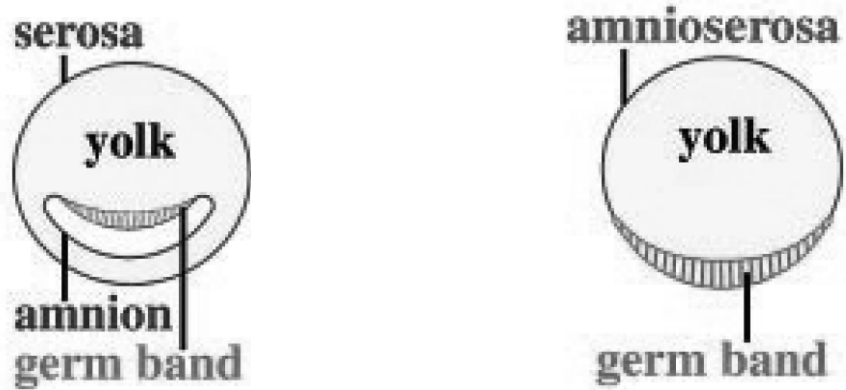
- Kopflappen
- Antennen
- gnathale Segmente mit Mundwerkzeugen
- 3 thorakale Segmente
- abdominale Segmente (maximal 10)
- Wachstumszone
- Extraembryonale Gewebe (Amnion, Serosa, Amnioserosa)
- vordere Darmanlage, hintere Darmanlage
- Vitellophagen (einzelne Zellen im Dotter)
- ZNS

Beantworten Sie die folgenden Fragen zu Experiment A:

Begründen Sie Ihre Antwort wenn möglich!

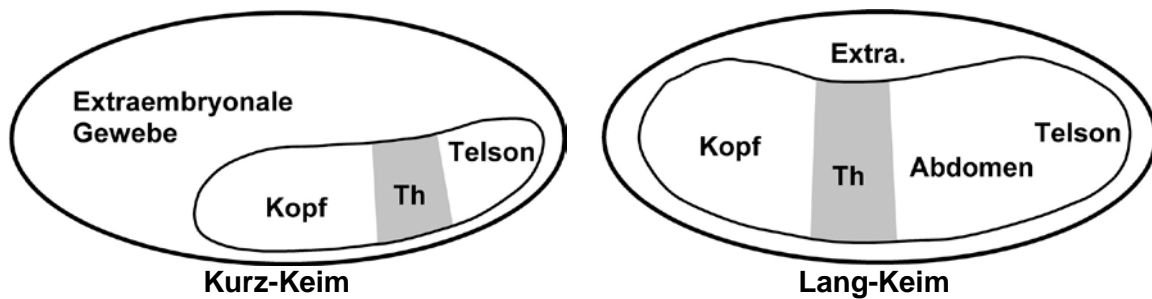
a) Welche Embryonen (*Drosophila* oder *Tribolium*) zeigen getrenntes Amnion und Serosa?

b) Welche Embryonen (*Drosophila* oder *Tribolium*) zeigen eine Amnioserosa?



c) Welche Embryonen (*Drosophila* oder *Tribolium*) können der Kurz-Keim-Entwicklung zugeordnet werden?

d) Welche Embryonen (*Drosophila* oder *Tribolium*) können der Lang-Keim-Entwicklung zugeordnet werden?



e) Welche Embryonen (*Drosophila* oder *Tribolium*) zeigen eine Wachstumszone mit sekundärer Segmentierung?

Versuch B Lebendbeobachtung der Entwicklung von Fliegen- und Froschembryonen

3.1. Einleitung

Die Lebendbeobachtung der Embryogenese erlaubt das Erstellen von Zeittafeln für die Abfolge der verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. für die Entstehung der unterschiedlichen Organe. Bei wechselwarmen Tieren ist die Embryonalentwicklung stark temperaturabhängig, sodass Zeittafeln nur für die jeweils angegebene Temperatur gültig sind.

3.2. Präparation zur Beobachtung von *Xenopus laevis* - Embryonen

Demonstration

(durchgeführt von Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsbiochemie, Prof. Pieler)

- Eiablage:

- Um die Eiablage für den folgenden Morgen zu stimulieren, wird einem Froschweibchen gegen 17 Uhr 50-100 U humanes Gonadotropin (500 U/ml) und gegen 23 Uhr je nach Größe des Weibchens nochmals 300-600 U (1.000 U/ml) mittels einer 1 ml-Spritze mit G27-Kanüle in den dorsalen Lymphsack injiziert
- Zur meist spontanen Eiablage werden die Weibchen über eine leere Petrischale gehalten und ihr Rücken sanft massiert

- In vitro – Befruchtung:

- Die Gelege werden mit Spermien aus frisch präparierten Hoden befruchtet. Um die Spermien freizusetzen, wird ca. 1/5 eines Hodens mit einer Mikroschere in 100 µl 1x MBSH mazeriert.
- Unmittelbar vor Gebrauch werden die in 1x MBSH inaktiven Spermien mit 900 µl dH₂O verdünnt. Durch die so erreichte Verringerung der Ionenkonzentration erlangen die Spermien ihre volle Beweglichkeit.
- Mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze werden die Spermien unverzüglich auf die frischen Gelege verteilt
- Das Gelege wird mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze zu einer Einzelschicht ausgebreitet, 2 Minuten inkubiert und dann mit 0,1x MBSH überschichtet.
Der Erfolg der Befruchtung ist nach ca. 30 Minuten daran zu erkennen, dass befruchtete Oozyten den animalen, dunkel pigmentierten Pol nach oben drehen
- Zum Entfernen der Gallerthülle wird eine Stunde nach der Befruchtung der Puffer abgegossen und 2 % Cystein (pH 7.8-8.0) zugegeben. Unter kreisförmigem Schütteln der Petrischale wird 3 Minuten inkubiert, anschließend werden die Embryonen 5 x mit 0,1 x MBSH gut gespült

Lebendbeobachtung:

- Die Entwicklung wird bei Raumtemperatur unter dem Binokular beobachtet
- Ausgelaufene oder sich nicht weiter entwickelnde Embryonen entfernen, da diese sonst vegammeln. Anschließend Medium wechseln (0,1X MBS)
- Am Abend und morgens Medium wechseln (0,1 MBS)

Ein Teil der befruchteten Oozyten wird bei 12,5°C weiterinkubiert, um spätere Entwicklungsstadien am Donnerstagnachmittag beobachten zu können (die Temperaturniedrigung bewirkt eine Entwicklungsverzögerung).

[MBSH (1x) 10 mM HEPES (pH 7.4), 88 mM NaCl, 1mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃,
0.82 mM MgSO₄, 0.41 mM CaCl₂, 0.66 mM KNO₃
2% Cystein: 2% (w/v) L-Cystein-HCl, pH mit NaOH auf 7.8-8.0 eingestellt

MBS (1X) Stammlösung unter dem Abzug, die Embryonen werden in einer 1:10 Verdünnung gehalten (0,1 MBS)]

3.3. Präparation zur Beobachtung von *Drosophila melanogaster* - Embryonen

- Sie erhalten eine halbe Apfelagarplatte mit *Drosophila* Eiern
- Embryonen (**möglichst viele**) werden von den Apfelsaftagarplatten mit Spritzflasche und Pinsel in ein Siebchen transferiert und mit dH₂O gespült. Die Platte hierfür mit viel Wasser einweichen; so lösen sich die Embryonen gut ab und können vorsichtig ins Sieb gespült werden

Dechorionisierung

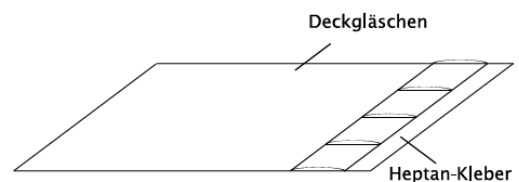
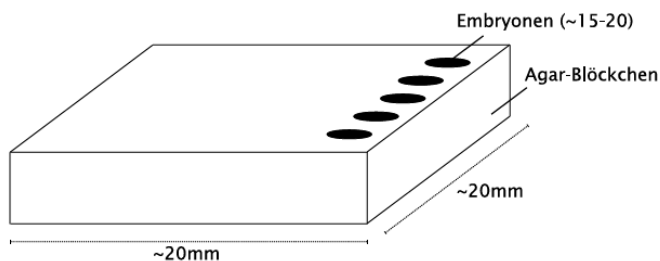
- Embryonen für 5 min im Sieb in einer Petrischale mit 50% Klorix inkubieren. Das Sieb dabei vorsichtig in der Flüssigkeit bewegen
(**Achtung:** Kittel, Handschuhe! Klorix ist ein starkes Bleichmittel. Aufpassen, dass keine Spritzer in Augen oder auf Kleider gelangen!)
- Waschen mit dH₂O-Spritzflasche.
- Am Stereomikroskop kontrollieren, ob bei den Embryonen das Chorion (Dorsalanhänge) komplett aufgelöst wurde (Embryonen glänzen)
- Nur wenn dies **nicht** der Fall ist erneut für wenige Minuten in Klorix inkubieren, waschen und kontrollieren



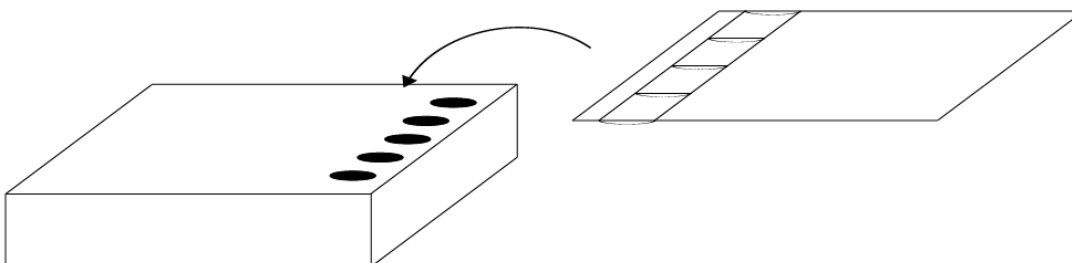
Klorix

Xi (reizend)

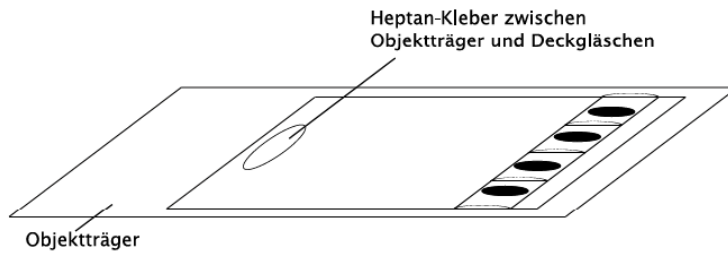
Aufreihung der Embryonen für die Mikroskopie



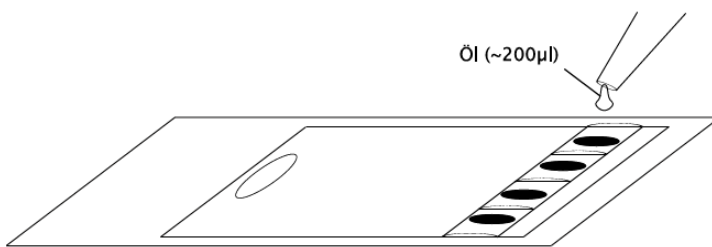
- 15 bis 20 Embryonen auf kleines Apfelsaftagarblöckchen (2 x 2 cm) übertragen und an dessen Kante in gleicher Ausrichtung in einer Reihe anordnen
Siebchen sofort gründlich säubern!
- An einer Seite eines 22 x 22 mm - Deckgläschens mit einer gelben Spitze *dünn* Heptankleber auftragen und einige Sekunden **antrocknen** lassen



- Das Deckgläschen umdrehen (Heptankleber unten!) und die Embryonen durch leichtes Andrücken vom Agarplättchen abnehmen



- Auf einen Objektträger einen kleinen Tropfen Heptankleber geben
- Deckgläschen erneut umdrehen (Embryonen oben!) und so auf den Objektträger legen, dass es vom Heptankleber-Tropfen festgehalten wird, dieser aber nicht unter den Embryonen liegt



- Embryonen vorsichtig mit einigen Tropfen *Voltalef-10S* - Öl überschichten (das Öl ist sehr viskos – langsam in die Pipette einsaugen, *abgeschnittene Spitze* verwenden!) Das Öl verhindert Austrocknung, ist aber O₂-durchlässig.
- Unter dem Mikroskop mit **10x Objektiv** und Hellfeld- oder Phasenkontrast-Optik beobachten (**kein anderes Objektiv verwenden, damit keine Verunreinigung mit Öl auftritt!**)
- Zwischen den Beobachtungsintervallen Licht ausschalten oder Objektträger vom Mikroskop entfernen (Licht-bedingte Hitzeentwicklung im Gewebe)
- Am Anfang alle 15 Minuten beobachten, später alle ½ Stunde

Diese Präparation wird einmal Mittwoch morgens durchgeführt (Beobachtung tagsüber) und einmal Mittwoch spätnachmittags für die Beobachtung späterer Stadien am Donnerstagnachmittag (die Embryonen für Donnerstag werden zur Entwicklungsverzögerung über Nacht bei 18°C gekühlt und hierfür eingesammelt).

3.4. Aufgabenstellung zu Experiment B

Verwenden Sie auch hier die Entwicklungstafeln, die sich am Ende des Skriptes befinden
(6.2: Entwicklungsstadien *Drosophila melanogaster* und 6.3: Entwicklungsstadien *Xenopus laevis*).

a) Tragen Sie in die unten stehende Tabelle Ihre Beobachtungen bezüglich Stadium und Dauer seit der Ablage ein!

Stadium <i>Drosophila</i>	Zeitpunkt: Stunden seit Ablage	Stadium <i>Xenopus</i>	Zeitpunkt: Stunden seit Ablage
4		1	
5		2	
8		3	
9		4	
11		5	
12		6	
13		7	
14		8	
15		9	
16		10	
17		11	
—		13/14	
—		16/17	
—		20	
—		22	
—		24	
—		26	
—		33	

b) Welchen Typus der Furchung zeigt *Drosophila* und welchen *Xenopus*?

c) Welche Arten von Gastrulationsbewegungen können Sie bei *Drosophila* und welche bei *Xenopus* beobachten?

Versuch C Kutikulapräparationen zur Analyse von Entwicklungsmutanten

4.1. Einleitung

Nach Abschluss der Embryogenese schlüpft bei *Drosophila* die erste Larve (bei 25°C ca. 22h nach Eiablage), die ein spezifisches Muster an Kutikula-Strukturen besitzt. Bestimmte Kutikulastrukturen können dabei einzelnen Segmenten zugeordnet werden.

Führt eine Mutation in einem Entwicklungsgen dazu, dass bestimmte Segmente oder Gewebe nicht ausgebildet werden, so führt dies bei Insektenembryonen nicht dazu, dass der ganze Embryo abortiert wird. Vielmehr entwickeln sich die nicht betroffenen Segmente und Gewebe annähernd normal und es entsteht eine Larve, in deren Kutikula Teilbereiche fehlen. Anhand der fehlenden Bereiche können Rückschlüsse auf die Funktion des mutierten Entwicklungsgens gezogen werden.

Die meisten Entwicklungsmutanten können nicht mehr selbständig aus dem Ei schlüpfen, da sie lethal sind. Deshalb müssen die Eihüllen (Chorion und Vitellinmembran) entfernt werden, um Kutikulastrukturen genau analysieren zu können. Um die Kutikulapräparationen so transparent als möglich zu erhalten, werden alle Weichgewebe durch Zugabe von Milchsäure aufgelöst. Durch Einbettung wird eine möglichst flache Präparation der Kutikula erhalten.

4.2. Versuchsdurchführung

- ▶ **beschriften** – am besten ganz zu Beginn!
Gruppennummer und Buchstabe des Fliegenstammes auf der Rückseite der **Agarplatte (nicht aufs Kollektionsgefäß)** (am Rand beschriften, damit das Klebeband die Beschriftung nicht überdeckt)
Platte mit einem Streifen Klebeband am Röhrchen befestigen
- ▶ **Hefe auf den Agarplatten** etwa eine Fingerkuppe Hefe mit dem Finger auf ca 5 Cent Durchmesser verteilen (sonst fällt die Hefe beim Herunterklopfen der Fliegen herunter)
- ▶ **Agarplatte nur auflegen und niemals andrücken!** Agar könnte ausgestanzt werden und anschließend ins Gefäß fallen
- ▶ sobald betäubte Fliegen in ein Röhrchen überführt wurden, muss dieses **liegend** gelagert werden, damit die Fliegen Sauerstoff bekommen ohne auf der feuchten Platte festzukleben. Danach wieder aufrecht stellen.

Jede Gruppe bereitet 6 verschiedene Fliegenstämme vor.

Diese sind mit Buchstaben codiert, welche für folgende Mutationsklassen stehen:

Fliegenstamm	Mutationsklasse	Anzahl pro Gruppe
A – L, X, Y	Segmentierungsmutanten (zygotisch)	4
O – U	Maternaleffektmutanten	2

Verkreuzung

zygotische Segmentierungsmutanten

- Kollektionsröhrchen werden beschriftet (**s. Kasten oben**)
- Die zygotischen Segmentierungsmutanten werden unbetäubt in neue Kollektionskäfige umgeschüttelt
- Auf die Kollektionsgefäße wird eine mit etwas Hefe bestrichene Apfelagarplatte aufgelegt und mit Klebeband fixiert – beschriften!

Maternaleffektmutanten

Die benötigten homozygoten Weibchen besitzen folgende vom Fliegenstamm abhängige Selektionsmarker:

Fliegenstamm	Selektionsmarker
O	weiße Augen & gerade Flügel (nicht <i>curly</i>)
P	normallange Borsten am Körper (nicht <i>stubbled</i>)
Q	gerade Flügel (nicht <i>curly</i>)
R	unregelmäßiges Facettenmuster (<i>rough eyes</i>)
S / T	normallange Borsten am Körper & unregelmäßiges Facettenmuster (nicht <i>stubbled</i> & <i>rough eyes</i>)
U	dunklerer Körper als heterozygote Fliegen (<i>ebony</i>)

- Die **Maternaleffektmutanten** werden für die Verkreuzung in Betäubungsgläsern mit Ether (in der Watte im Deckel) betäubt
- Etwa **25 homozygote Weibchen** (s. Selektionsmarker oben) werden herausortiert und mit Männchen aus demselben Röhrchen in ein neues Kollektionsgefäß verkreuzt
- Auf das Kollektionsgefäß wird eine mit etwas Hefe bestrichene Apfelagarplatte aufgelegt und mit Klebeband fixiert – beschriften!
- Röhrchen hinlegen bis die Fliegen nicht mehr betäubt sind



Ether

F+ (hochentzündlich)

Alle 6 Kreuzungsansätze werden gesammelt und bis Dienstag in einen 25°C - Inkubator gestellt; am nächsten Tag werden die Agarplatten – auf welchen sich nun die benötigten Eier befinden – von den Betreuern abgenommen und bis Mittwoch erneut bei 25°C inkubiert, damit alle abgelegten Embryonen die Entwicklung zur L1 Larve beenden können.

Embryokollektion (Mittwoch)

- Embryonen (**möglichst viele**) werden von den Apfelsaftagarplatten mit einem Pinsel in ein Siebchen transferiert und mit dH₂O gespült. Die Platte hierfür mit viel Wasser einweichen; so lösen sich die Embryonen gut ab und können vorsichtig ins Sieb gespült werden. In der Hefe sammeln sich geschlüpfte Wildtyp-Larven – diese soweit wie möglich nicht transferieren.

Dechorionisierung

- Embryonen für 5 min in einer Petrischale mit 50% Klorix inkubieren (Achtung! Kittel und Handschuhe! Klorix ist ein starkes Bleichmittel aufpassen, dass keine Spritzer in Augen oder auf Kleider gelangen!)
- Waschen mit dH₂O-Spritzflasche



Klorix
Xi (reizend)

Devitellinisierung

- Transferieren der Embryonen mit Pinsel in ein Eppendorf-Gefäß mit 300 µl Heptan
- Zugabe von 500 µl Methanol und jeweils etwa 10 Sekunden vortexen
- Zugabe von weiteren 500 µl Methanol und erneutes Vortexen (Heptan soll sich komplett im Methanol auflösen)
- Flüssigkeit entfernen, 1 ml Methanol zugeben
- Siebchen sofort gründlich säubern!



Heptan
F (leichtentzündlich)



Methanol
F (leichtentzündlich)



T (giftig)

alle sechs Ansätze bis hier vorbereiten

damit die nächsten Schritte mit allen Ansätzen gleichzeitig durchgeführt werden können

Kutikulapräparation

- Embryonen absinken lassen und das Methanol so vollständig wie möglich entfernen (Embryonen bleiben im Gefäß!)
- Zugabe von 1 ml Eisessig-Glycerol
- Inkubation für 2 h bei 65°C im Heizblock
- Nach der Inkubation werden 800µl des Eisessig- Glycerol-Gemisches entfernt
- Die Embryonen werden in möglichst wenig Flüssigkeit mit Hilfe einer abgeschnittenen blauen Spitze auf einen Objektträger gebracht
- Mithilfe eines Papiertuchs wird überschüssige Flüssigkeit so vollständig wie möglich abgenommen
- Mit abgeschnittener gelber Spitze werden 75 µl cc Einbettungsmedium hinzugegeben (Milchsäure: Hoyers mountant, „MH“)
- Vorsichtig Deckgläschen (24 mm x 40 mm) auflegen
- Die fertigen Objektträger werden eingesammelt und über Nacht bei 65°C inkubiert
- Die Analyse der Kutikulapräparation findet am Donnerstag unter dem Mikroskop mit Dunkelfeld-Einstellung („DF“) statt



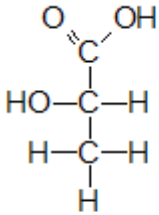
Milchsäure
Xi (reizend)



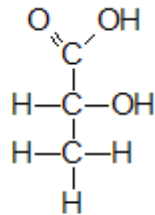
Chloralhydrat
T (giftig)

[Hoyers mountant:

30 g Gummi arabicum (Acacia Pulver)
 plus 50 ml ddH₂O
 über Nacht gerührt bis Pulver vollständig aufgelöst.
 Unter ständigem Rühren 200 g Chloralhydrat zugeben.
 Zugabe von 20 g Glycerol und Mischen der Komponenten
 Zentrifugation bis das Einbettungsmedium klar ist
 (in der Regel 3 h bis über Nacht bei 12000 g)]

Milchsäure:

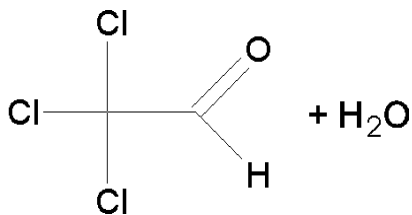
L-(+)-Milchsäure



D-(-)-Milchsäure

**Milchsäure**

Xi (reizend)

Chloralhydrat:**Chloralhydrat**

T (giftig)

4:1 - Eisessig:Glycerol

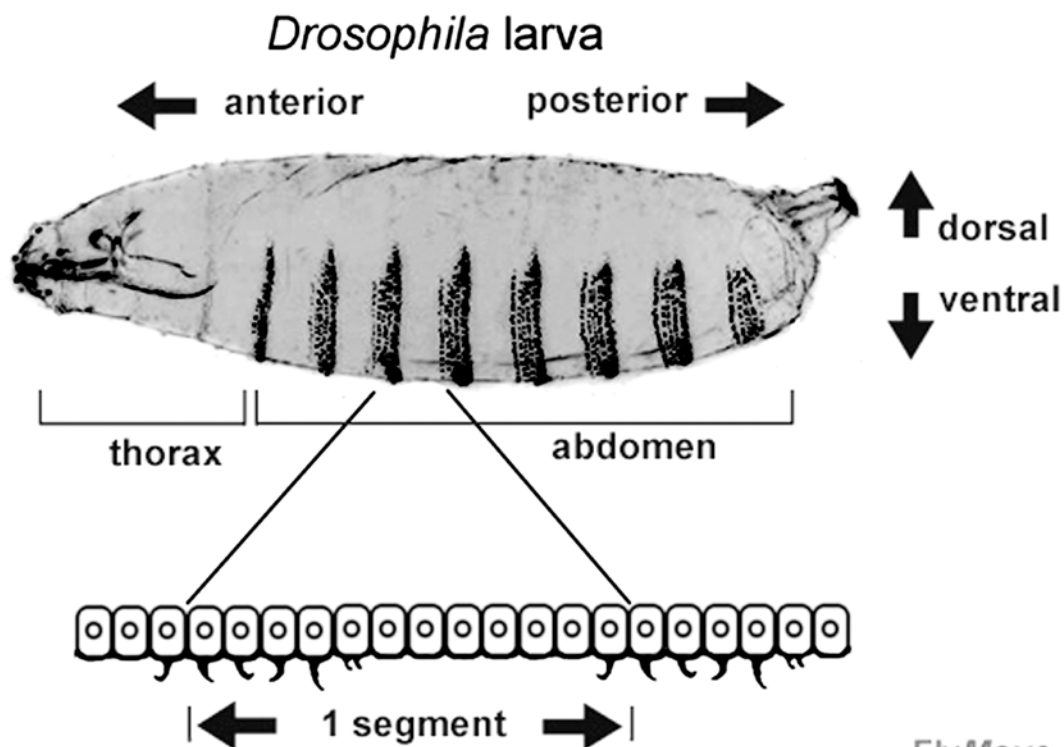
20 g Glycerol plus 100 ml Eisessig

4.3. Aufgabenstellung zu Experiment C

Die Auswertung der Kutikula-Präparate beruht auf dem Vergleich der mutanten Phänotypen mit normalen, nicht mutierten Tieren. Es ist daher notwendig, Abweichungen der vorliegenden Kutikulas erkennen zu können, um so zu entscheiden, welche Genklasse durch eine Mutation betroffen sein könnte.

Die untere Abbildung zeigt die Kutikula eines wildtypischen Embryos mit seinen spezifischen Erkennungsmerkmalen:

- larvaler **Kopf** mit innen liegenden **Mundwerkzeugen**
- **3 thorakale Zähnenbänder** (meist nur schwach zu erkennen)
- **8 abdominale Zähnenbänder** (das erste deutlich schmaler als die anderen)
- **posteriore Spirakel** („posterior spiracles“) am Hinterende

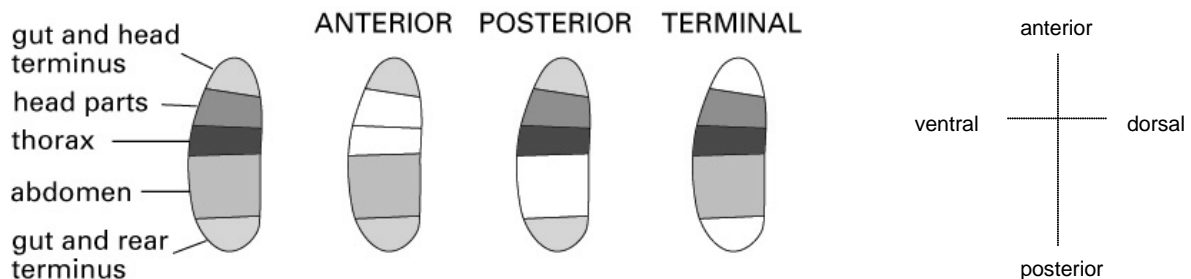


Untersuchen Sie Ihre Embryonen und entscheiden Sie, zu welcher Genklasse die Mutation gehört (siehe Hinweise auf den nächsten Seiten).

Nehmen Sie sich Zeit für die Auswertungen! Sehen Sie alle Tiere auf dem Objektträger durch, um einen Eindruck von der (innerhalb einer Linie oft unterschiedlich starken) Ausprägung der Mutation zu bekommen. Oft ist es zudem hilfreich, eine schematische Zeichnung von dem anzufertigen, was Sie sehen. Bitte begründen Sie Ihre Entscheidung (Stichworte).

Maternale Mutanten

Die folgende Grafik gibt eine schematische Übersicht über die maternalen Systeme der anteroposterioren Körperachse des Embryos und darüber, welche Körperabschnitte bei Mutation des **anterioren**, **posterioren** bzw. **terminalen Systems** betroffen sind:



Zusätzlich zu diesen drei maternalen Systemen gibt es ein viertes, das die Gliederung des Embryos entlang der **dorsoventrale** Achse bestimmt. Mutationen, die das dorsoventrale System betreffen, sind in einigen Fällen nur schwer zu erkennen. So können zum Beispiel die ventralen Zähnchenbänder komplett fehlen (=dorsalisierter Embryo) oder überall ausgeprägt sein (=ventralisiert). Zum Teil sehen diese Kutikulas nicht mehr wie Larven aus.

a) Zu wieviel Prozent erwarten sie die mutanten Phänotypen? Wie hoch ist der Anteil tatsächlich? Begründung?

b) Ordnen Sie die beiden **Maternaleffektmutationen** in der unteren Tabelle einem der verschiedenen maternalen Systeme zu:

- anterior
- posterior
- terminal
- dorsoventral

Fliegenstamm	betroffenes System	Begründung

Zygotische Mutanten

Auch bei der Auswertung der zygotischen Mutanten ist eine genaue Betrachtung der Präparate unerlässlich. Beachten Sie die unten aufgeführten Kriterien für die verschiedenen Genklassen. Nicht immer sind die Mutationen auf den ersten Blick zu erkennen.

Genklasse	Mutation
Lücken-Gen	zusammenhängende Segmentbereiche fehlen
Paarregel-Gen	jedes zweite Segment betroffen (weniger Segmente, aber sowohl thorakale als auch abdominale sichtbar)
Segmentpolaritäts-Gen	Teilbereich jedes Segments betroffen, spiegelbildliche Ersetzung durch verbliebene Bereiche (Zahl der Zähnchenbänder normal, aber gestörtes Aussehen bei allen)
homöotisches Gen	ursprüngliche Identität von Segmenten gestört (Zahl der Zähnchenbänder normal, aber falsche Identität)

a) Zu wieviel Prozent erwarten sie die mutanten Phänotypen? Wie hoch ist der Anteil tatsächlich? Begründung?

b) Ordnen Sie die vier **zygotischen Segmentierungsmutationen** in der unteren Tabelle jeweils einer der Segmentierungs-Genklassen zu!

Fliegenstamm	betroffene Genklasse	Begründung

Versuch D Nachweis der lacZ-Reportergen-Expression mittels X-Gal-Färbung

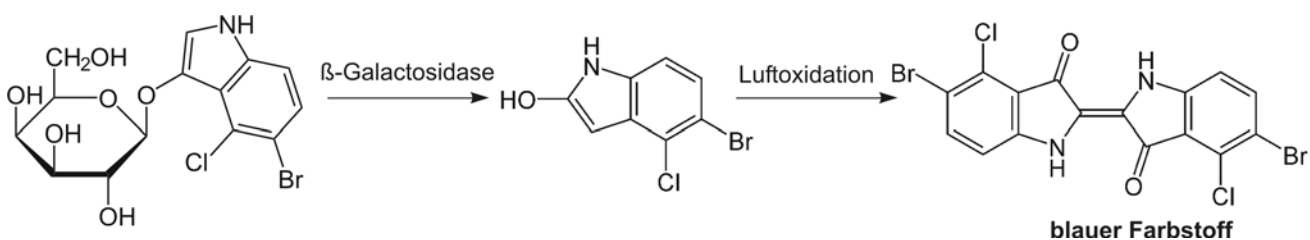
5.1. Einleitung

Um zu untersuchen, ob ein DNA-Bereich Enhancer- bzw. Promotorfunktion hat, wird dieses Fragment vor ein Reportergene kloniert. Dieses wird dann als Transgenkonstrukt mittels Keimbahntransformation in das Genom eines Organismus eingebracht. Nun steht das Reportergen unter der Kontrolle des DNA-Fragments, d.h. die Reportergenexpression zeigt, ob *cis*-regulatorische Elemente enthalten sind und in welchen Geweben sie aktiv sind.

Als Reportergene werden häufig das bakterielle Gen *lacZ* und das Quallengen *green fluorescent protein* (*Gfp*) bzw. dessen Derivate eingesetzt. *Gfp* und dessen Derivate haben den Vorteil, dass die Fluoreszenz des Genprodukts *in vivo* detektiert werden kann. Nachteile von *Gfp* sind die geringere Sensitivität und die Verzögerung der Nachweisbarkeit aufgrund der Dauer für die richtige Faltung und Reifung des Proteins (mehrere Stunden). Das *lacZ*-Gen bietet eine höhere Sensitivität. Zum Nachweis müssen die Gewebe jedoch fixiert werden.

lacZ-Expression kann sowohl durch *in situ*-Hybridisierung als auch durch Antikörperfärbung gegen β -Galactosidase nachgewiesen werden. Zudem kann die Enzymaktivität der β -Galactosidase für den Nachweis der Reportergenexpression herangezogen werden. Dazu wird X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid) als Substrat verwendet. Die β -Galactosidase spaltet das farblose X-Gal, wobei das unlösliche, tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo freigesetzt wird.

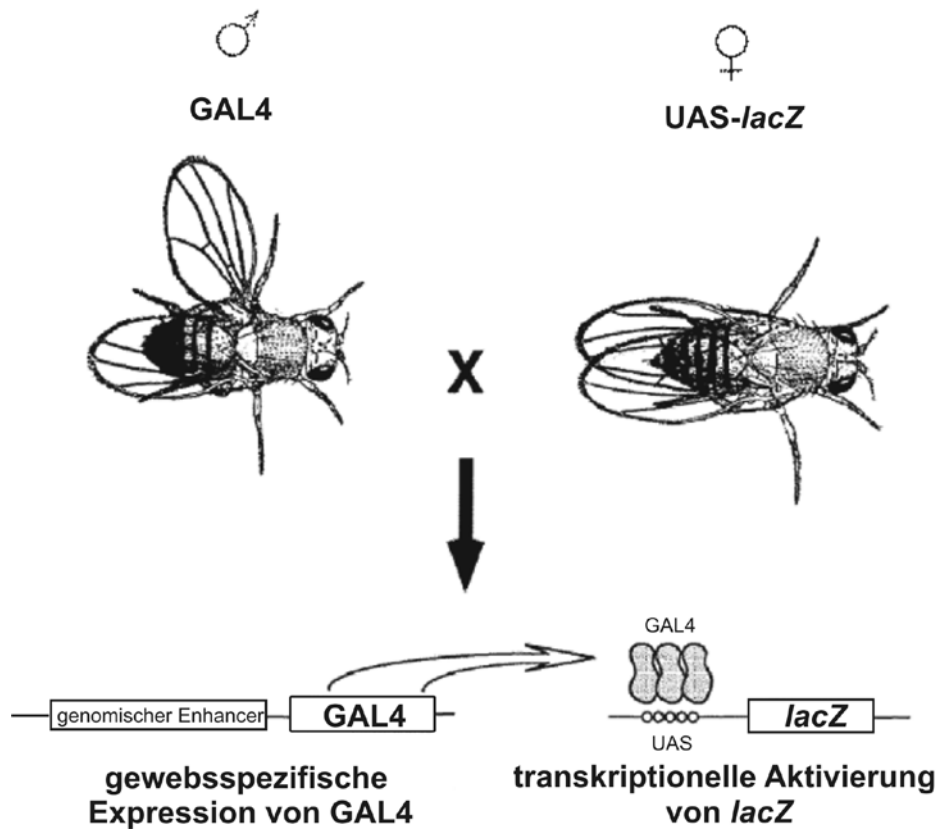
Die blaue Färbung zeigt somit die Expression des Reportergens *lacZ* an. Entscheidend bei dieser Färbung ist, dass nach der Fixierung keine Devitellinisierung durchgeführt wird, da das dabei eingesetzte Methanol die Enzymaktivität der β -Galactosidase nachhaltig beeinträchtigt.



Enhancer können auch im Zuge von Transposonmutagenesen aufgespürt werden. Dazu muss das Mutator-Transposon ein Reportergen tragen, das unter der Kontrolle eines basalen Promotors steht, auf den Enhancer wirken können. Insetiert das Mutator-Transposon in der Nähe eines Enhancers, kann dieser die Reportergenexpression treiben. Aufgrund der Reportergenexpression können so Enhancer aufgespürt werden ("Enhancer-Trapping").

Verwendet man im Mutator-Transposon anstelle des Reportergens einen heterologen Transaktivator (z.B. GAL4), kann der "Enhancer Trap" als Werkzeug für die ektopische Expression von Genen benutzt werden. Das exprimierte GAL4 kann an sogenannte UAS-Sequenzen binden und nachgeschaltete Gene aktivieren (Brand und Perrimon, 1993).

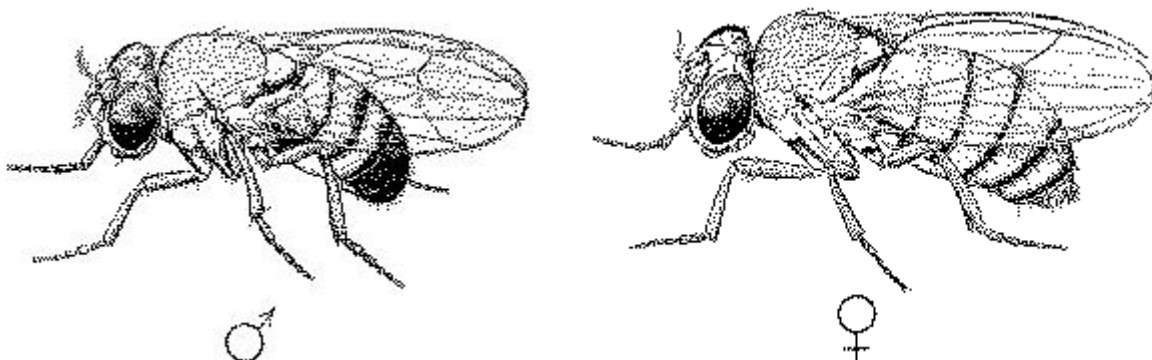
Kreuzt man Fliegenlinien, die definierte Enhancer-GAL4-Konstrukte oder GAL4-Enhancer-Traps tragen, mit einer Linie, die ein UAS-Gen X-Konstrukt trägt, wird das Gen X in dem durch den Enhancer vermittelten Expressionsmuster exprimiert.



Im Praktikum erhält jede Gruppe vier bekannte Enhancer-GAL4-Linien und zwei noch nicht untersuchte, potentielle Enhancer Trap-Linien aus einer durchgeführten Transposonmutagenese (die GAL4-Linien werden auch als „Treiberlinien“ bezeichnet, weil sie das GAL4-UAS-System „antreiben“).

Männchen dieser GAL4-Linien werden mit ebenso ausgeteilten Jungfrauen einer UAS-*lacZ*-Linie verkreuzt. In deren Nachkommen werden gewebsspezifische Expressionsmuster und potentielle Enhancer-Traps sollen durch eine β-Galactosidase-Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht. Die X-Gal-Färbung weist die Expression des Reportergens *lacZ* nach.

Die untere Abbildung soll Ihnen dabei helfen, männliche und weibliche Fliegen zu unterscheiden.



Quelle: <http://post.queensu.ca/~forsdyke/homepage.htm#Homepage>

Männliche Fliegen sind generell etwas kleiner als Weibchen. Das männliche Abdomen ist dunkler gefärbt als das weibliche und läuft außerdem weniger spitz zu.

5.2. Kreuzungen für die GAL4/UAS - getriebene lacZ-Reporter-gen-expression

► Kollektionsgefäße beschriften

– Gruppennummer und Buchstabe des Fliegenstammes auf einem Stück Klebeband **auf dem Röhrchen** selbst

► jungfräuliche Fliegen zu den Männchen geben solange diese noch betäubt sind

► Hefe auf den Agarplatten mit dem Finger etwas verstreichen (beim Herunterklopfen der Fliegen kann die Hefe sonst abfallen)

► Agarplatte nur auflegen und **niemals andrücken!**

Platte mit einem Streifen Klebeband am Röhrchen befestigen

► sobald betäubte Fliegen in ein Röhrchen überführt wurden, muss dieses **liegend** gelagert werden, damit die Fliegen Sauerstoff bekommen

► Handschuhe!

Sie erhalten Fliegen, die aus folgenden Linien stammen:

Fliegenstamm	Linie	Anzahl pro Gruppe
1-7	Enhancer bekannt	4
249, 251, 257, 258	Enhancer unbekannte („Enhancer Trap“)	2
101, 104	jungfräuliche Weibchen	6

Alle 6 ausgeteilten Treiberlinien werden nach gleichem Schema mit Jungfrauen erkreuzt:

- Für jede Kreuzung werden die Fliegen aus dem ausgeteilten Anzucht-röhrchen ins Betäubungsgefäß gegeben und betäubt
- Etwa 20 betäubte Männchen werden herausgesammelt und in ein neues, beschriftetes Kollektionsröhrchen gegeben
- Direkt im Anschluss wird ein Röhrchen mit Jungfrauen *ohne Betäubung* in das gleiche Gefäß geschüttelt
- Auf die Kollektionsgefäße wird eine mit etwas Hefe bestrichene Apfelagarplatte aufgelegt und mit Klebeband fixiert
- Röhrchen hinlegen bis die Fliegen nicht mehr betäubt sind



Ether

F+ (hochentzündlich)

Die Fliegen werden, wenn alle Tiere aufgewacht sind, an eine ruhige Stelle des Gruppenplatzes gestellt (Agarplatte unten).

Sowohl am *Mittwoch* als auch am *Donnerstag* werden die *alten Platten abgenommen*, verworfen und gegen frische Platten mit Hefe ausgetauscht. Dadurch gewöhnen sich die Fliegen an die Umgebung, und legen daher mehr Eier ab.

Am *Freitag* findet eine Kollektion der abgelegten Embryonen statt und sie werden nach unten stehendem Protokoll behandelt.

5.3 Fixierung von *Drosophila melanogaster* - Embryonen für X-Gal-Färbung

Gewinnung von *Drosophila melanogaster* - Embryonen

- Embryonen (**möglichst viele**) werden von den Apfelsaftagarplatten mit einem synthetischen Pinsel in ein kleines Siebchen transferiert und mit dH₂O gespült. Auch die Hefe auflösen und die dort gelegten Eier sammeln.

Dechorionisierung

- Embryonen für 5 min in einer Petrischale mit 50% Klorix inkubieren (Achtung! Kittel und Handschuhe!)
- Am Stereomikroskop kontrollieren, ob bei den *Drosophila*-Embryonen das Chorion (Dorsalanhänge) komplett aufgelöst wurde
- Waschen mit dH₂O-Spritzflasche



Klorix
Xi (reizend)



Heptan
F (leichtentzündlich)

Fixierung

- Transferieren der Embryonen mit Pinsel in ein **1,5 ml Eppendorf-Gefäß** mit:
0,4 ml *Drosophila-Embryo-Fix-Puffer*
0,4 ml Heptan

alle sechs Ansätze bis hier vorbereiten

damit die nächsten Schritte mit allen Ansätzen gleichzeitig durchgeführt werden können

- **50 µl** 37% Formaldehyd (Fixativ) zugeben
- Dann Embryonen für **20 min fixieren** lassen (auf Drehrad)
- Siebchen sofort gründlich säubern!
- Färbelösung vorbereiten: 6 Eppendorf-Gefäße mit
800µl PB3X
50µl 100mM K₃[Fe^{III}(CN)₆]
50µl 100mM K₄[Fe^{II}(CN)₆]



Formaldehyd
T (giftig)

Achtung: diese Salze sind in wässriger Lösung nicht giftig, können aber bei Zugabe von Säure Blausäure freisetzen

bei 37°C in den Heizblock stellen, bis die Lösung in 5.4 benötigt wird

- **Keine Devitellinisierung !!**
(Methanol würde die Funktion von β-Galactosidase beeinträchtigen)
- Entfernen Sie zunächst die untere Phase
(Embryonen bleiben zurück; wässrige Phase enthält Fixativ: „Organischer Abfall“)
- Entfernen Sie den größten Teil der Heptanphase
(„Organischer Abfall“)
- Waschen Sie 5 mal für 5 Minuten mit PB3X
(im letzten Waschschrift wird das PB3X nicht wieder abgenommen)
- Die Embryonen werden im nächsten Versuchsteil für die X-Gal-Färbung weiterverwendet

[Drosophila-Embryo-Fix -Puffer 0.1 M HEPES pH 6.9
(aufbewahrt bei 4°C)

2 mM MgSO₄

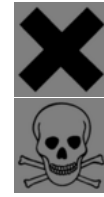
1 mM EGTA

PBS: 140 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄

PB3X: PBS + 0,3% Triton-X100]

5.4. β -Galactosidase-Aktivitätsfärbung (X-Gal-Färbung)

- PB3X des letzten Wasch-Schrittes vorsichtig entfernen
 - Jeweils 900 μ l vorgewärmte Färbelösung hinzugeben
Embryonen in Färbelösung für 10min bei 37°C im Heizblock inkubieren
 - Zugabe von 100 μ l X-Gal Lösung (20 mg/ml in DMF)
Gefäß invertieren (vorsichtig drehen)
 - Inkubation bei 37°C (Heizblock) mit gelegentlichem Invertieren der Reaktionsgefäße
- !!** Die Färbungen können unterschiedliche lang dauern! Ansätze regelmäßig überprüfen!
- Sobald die Embryonen beginnen sich zu färben:
 - mithilfe einer abgeschnittenen blauen Spitze einige Embryonen in ein Wägeschälchen (beschriften!) geben und unter dem Binokular ansehen
 - die Färbung kann, in Abhängigkeit von der Fliegen-Linie, auch nur kleine Bereiche des Embryos betreffen – nicht immer ist der Embryo großflächig gefärbt
 - Bei ausreichend gefärbten Embryonen (Betreuer fragen) wird die Färbereaktion abgestoppt
 - Abstoppen der Färbung: 3x mit PB3X spülen.
 - Damit die Färbung nicht diffundiert, fixieren Sie die Embryonen für 15 min (auf dem Drehrad):
0,4 ml HEPES-Puffer
25 μ l 37% Formaldehyd
 - Entfernen Sie das Fixativ ("Organische Lösungsmittel"-Abfall) und waschen Sie 2X mit PB3X

**X-Gal**

Xi (reizend)

T (giftig)

Einbettung

- Embryonen absinken lassen
- PB3X vorsichtig abnehmen
- 1ml 60% Glycerin zugeben und mehrfach invertieren
- Embryonen absinken lassen (dauert länger, da viskos), 2/3 des Glycerins abnehmen
- Embryonen mit abgeschnittener blauer Spitze in etwas Glycerin aufnehmen und in der Spitze absinken lassen
- Mit wenig Glycerin mittig auf einen Objektträger geben
- Deckgläschen (24 mm x 40 mm) auflegen
- Analyse der X-Gal-Färbung unter dem Mikroskop mit Hellfeld-Einstellung

[PBS: 140 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄

PB3X: PBS + 0,3% Triton-X100]

5.5. Aufgabenstellung zu Experiment D

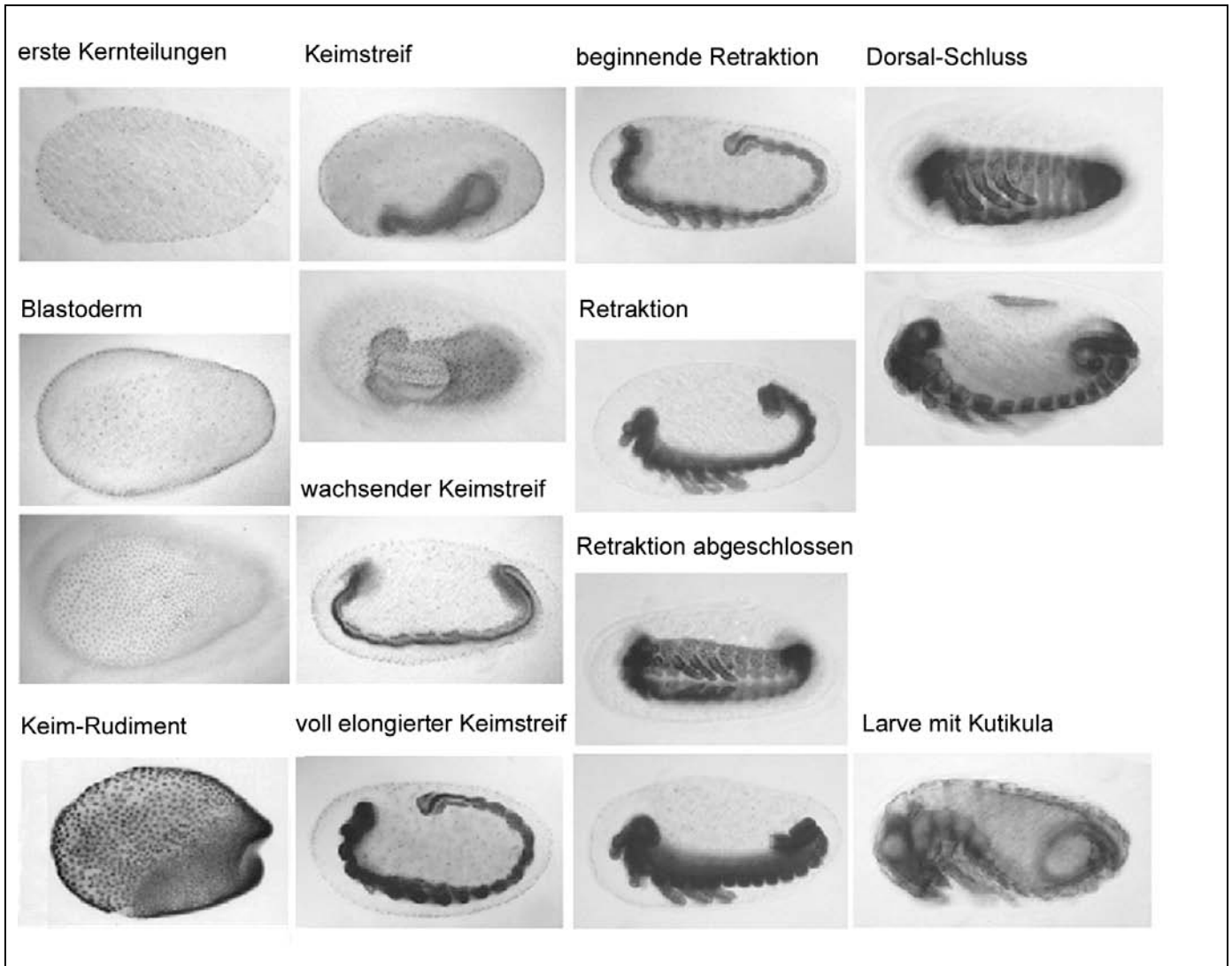
Verwenden Sie die im Anhang angeführten Tafeln, auf denen verschiedene Gewebe von *Drosophila* gezeigt werden (6.4: *Organsysteme in Drosophila melanogaster*). Beachten Sie dabei, dass nicht immer das gesamte, in der Tafel gezeigte Gewebe gefärbt sein muss! Oft treten unterschiedlich stark gefärbte Embryonen auf – auch hier kann es hilfreich sein, das Gesehene zu skizzieren.

a) Finden Sie heraus, in welchen Geweben Ihre Linien Reportergen-Expression vermitteln.

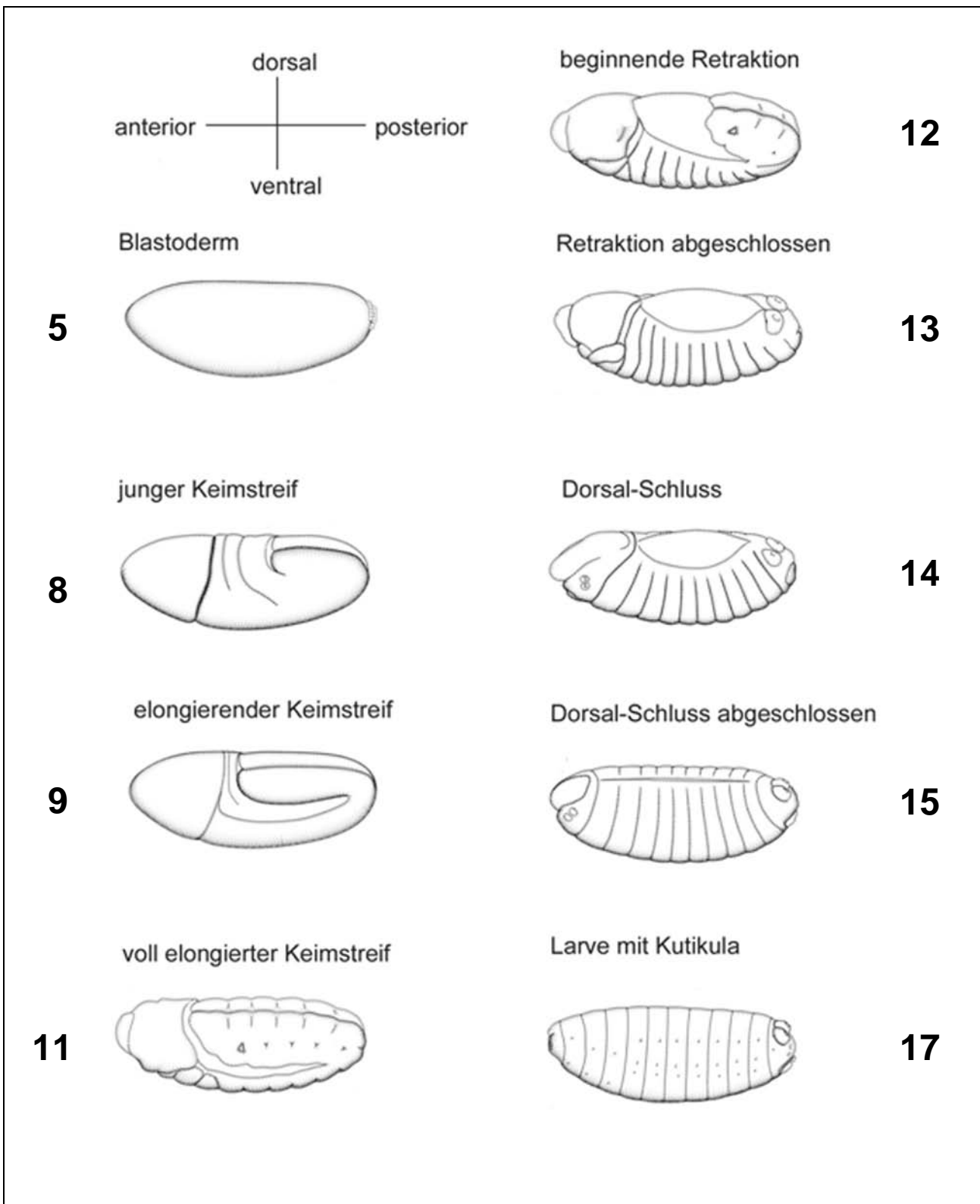
	Fliegenstamm	gefärbtes Gewebe	Skizze
Enhancer-GAL4-Linien (1-7)			
Enhancer-Trap-Linien (249, 251, 257, 258)			

Anhang

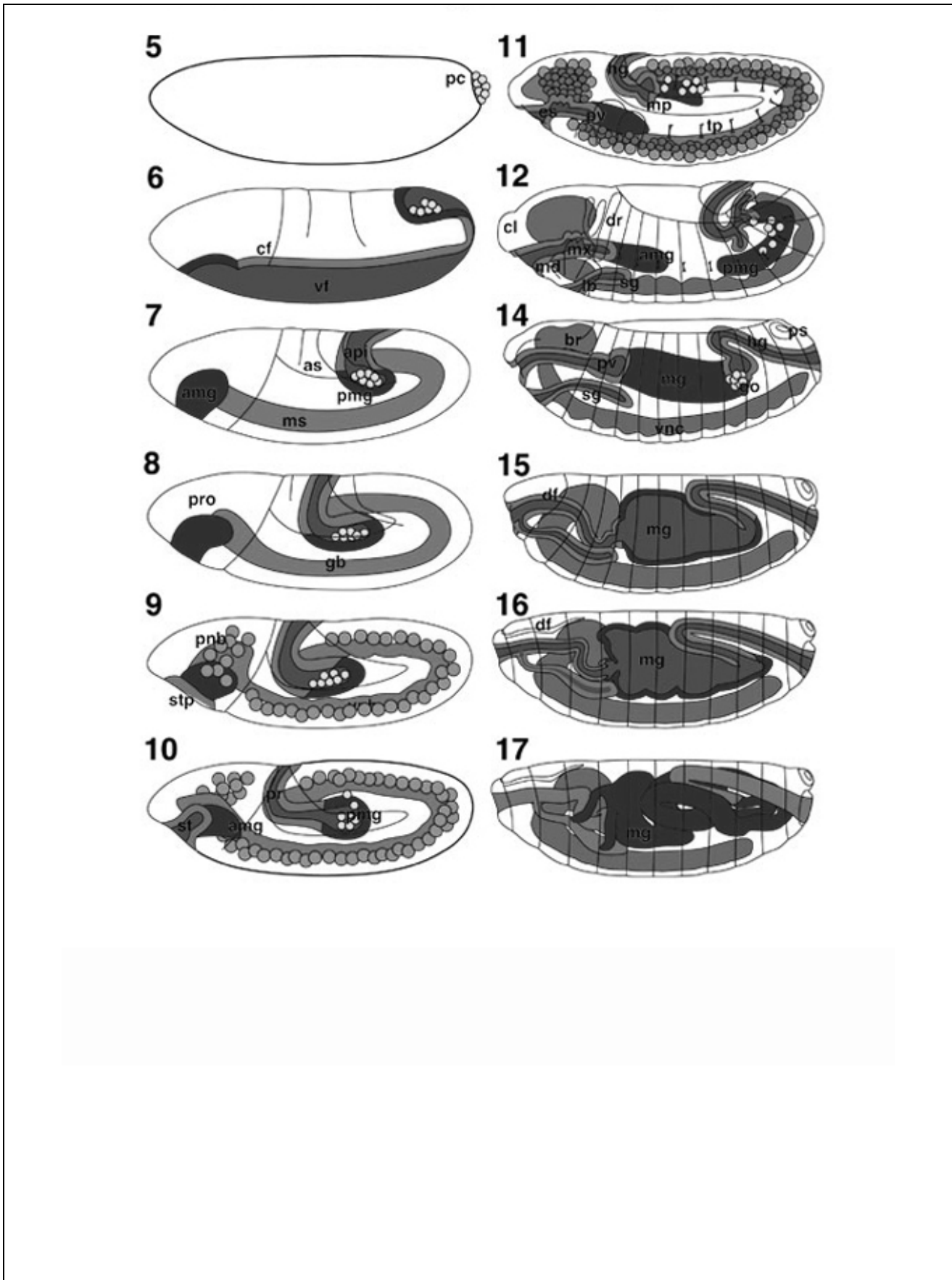
6.1 Entwicklungsstadien *Tribolium castaneum*



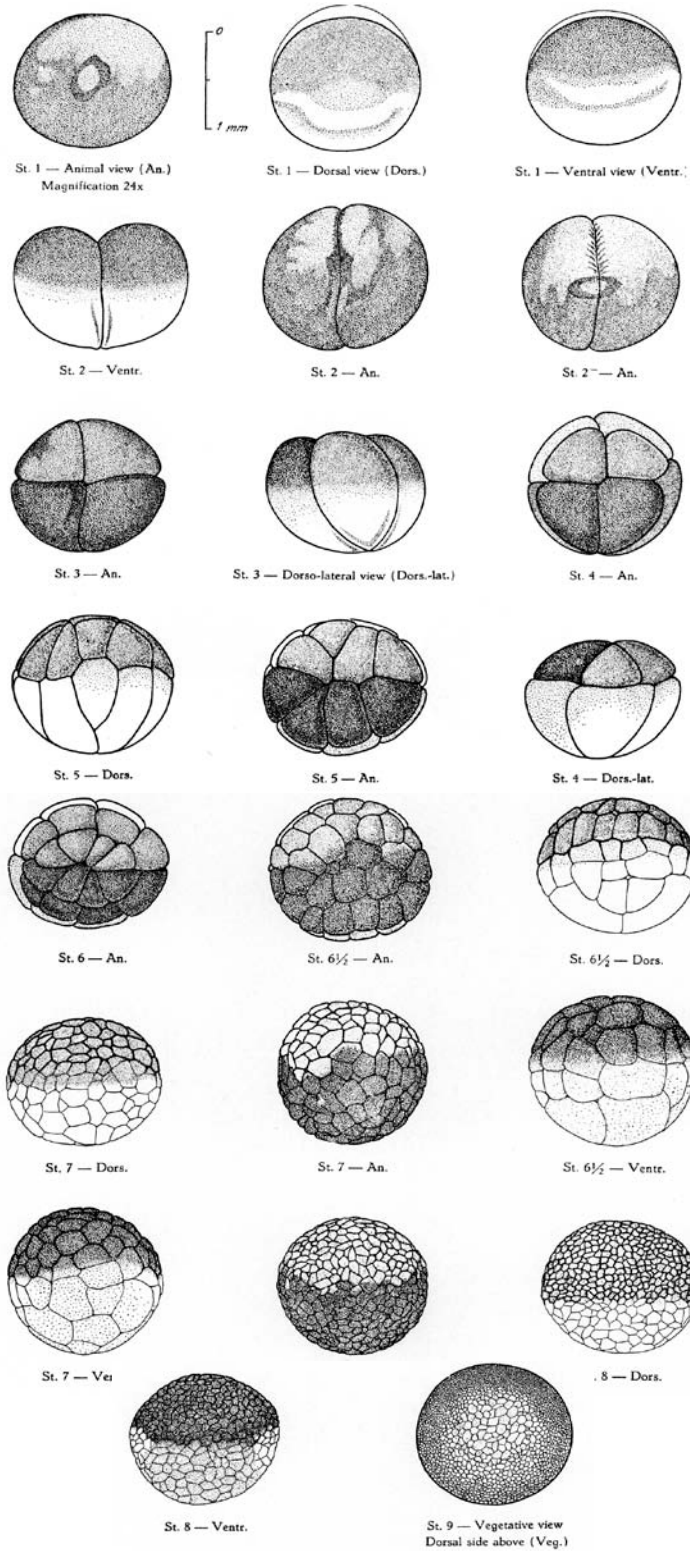
6.2 Entwicklungsstadien *Drosophila melanogaster*



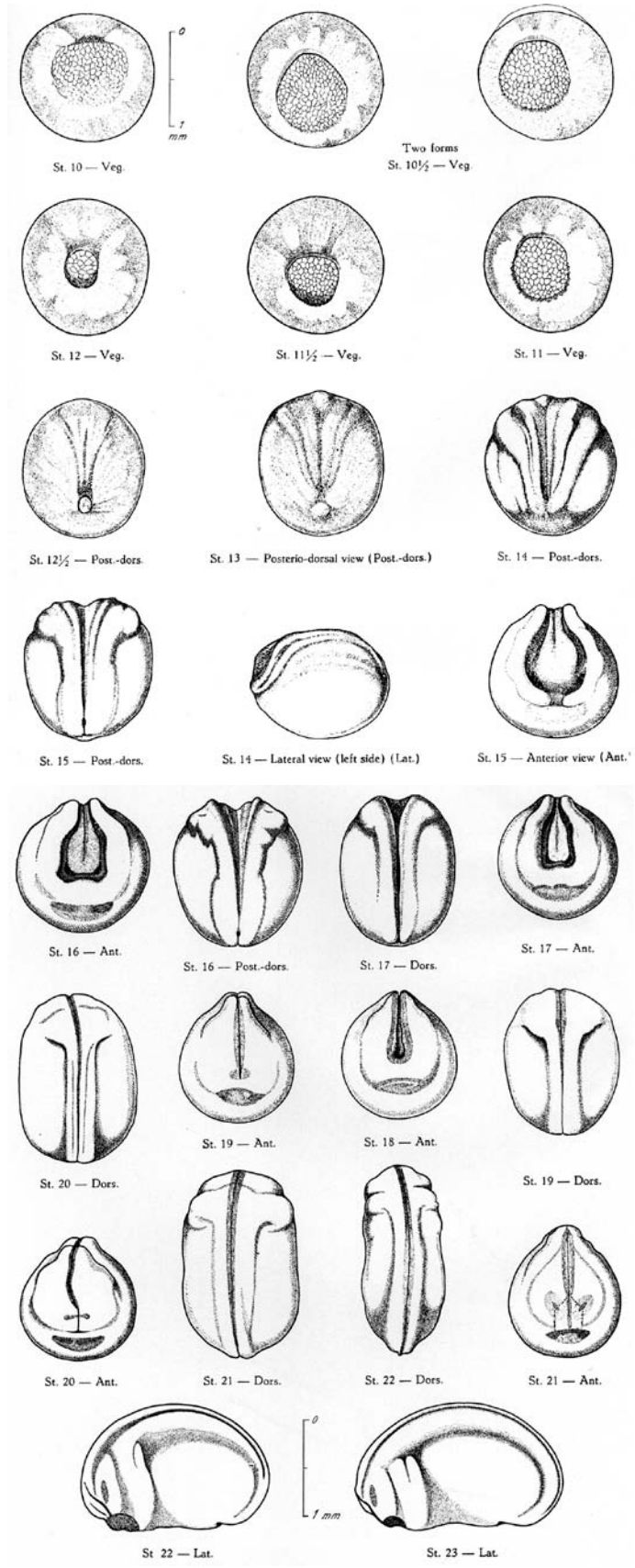
(aus „Atlas of *Drosophila* Development“, Volker Hartenstein, CSHL Press, 1993)

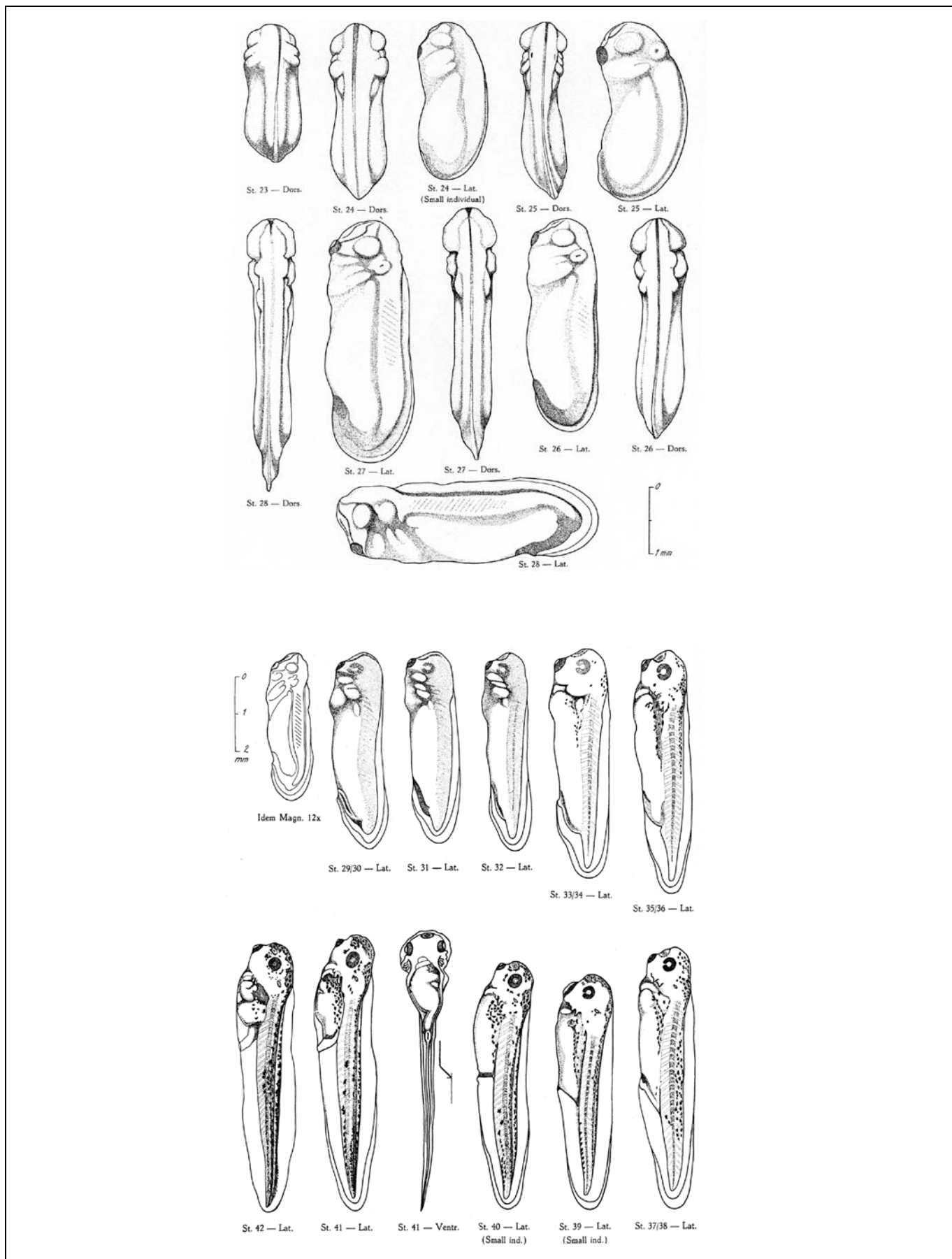


(aus „Atlas of *Drosophila* Development“, Volker Hartenstein, CSHL Press, 1993)



6.3 Entwicklungsstadien *Xenopus laevis*

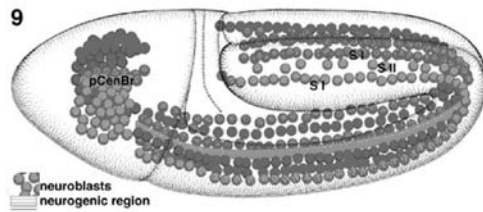
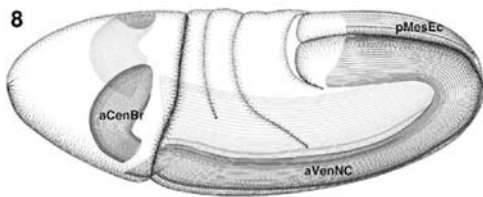
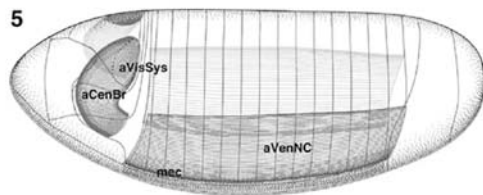




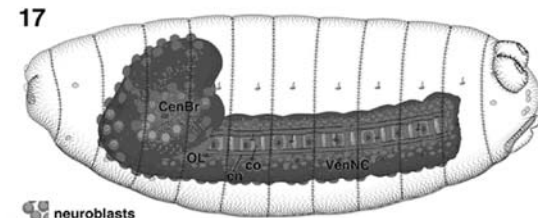
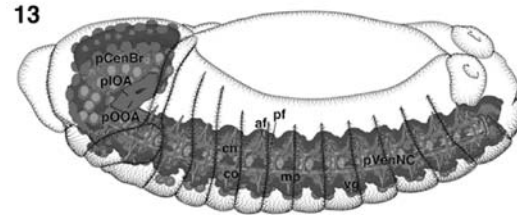
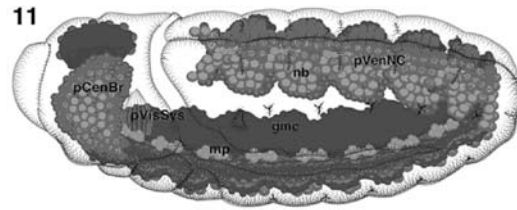
(Stadienabbildungen aus „Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin)“, P.D. Nieuwkoop und J. Faber)

6.4 Organsysteme in *Drosophila melanogaster*

Central Nervous System

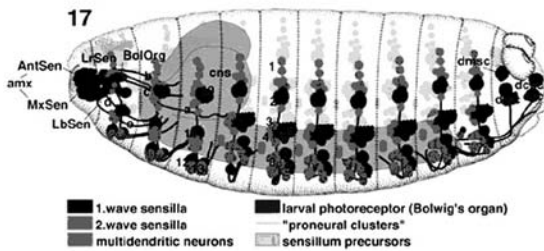
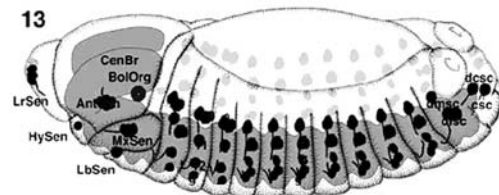
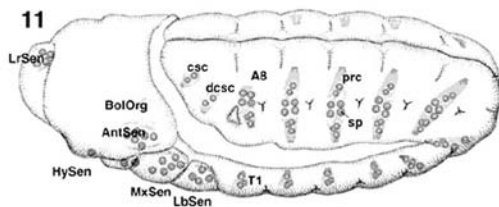


neuroblasts
neurogenic region



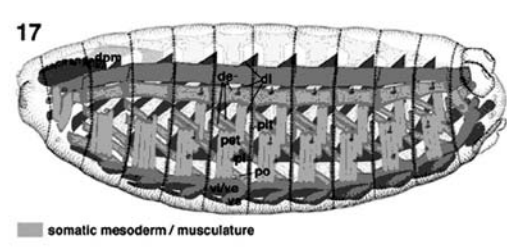
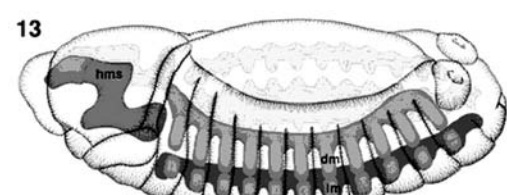
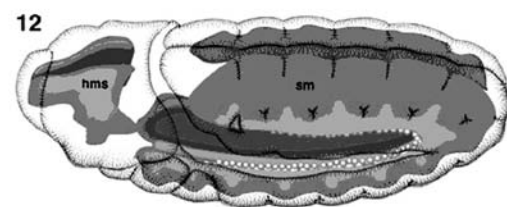
neuroblasts
ganglion mother cells/ neurons

Peripheral Nervous System



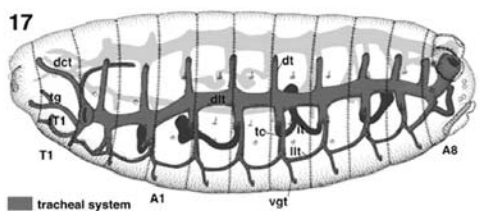
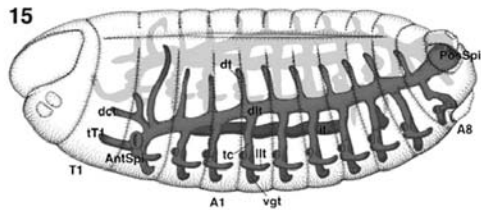
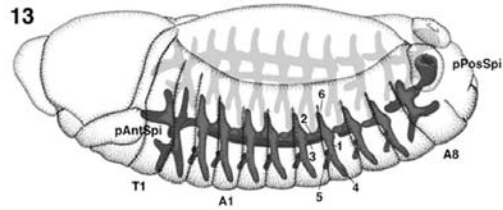
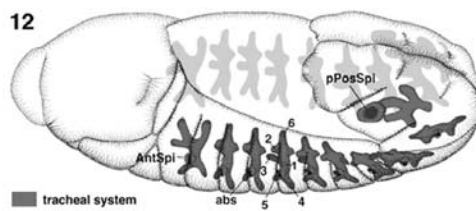
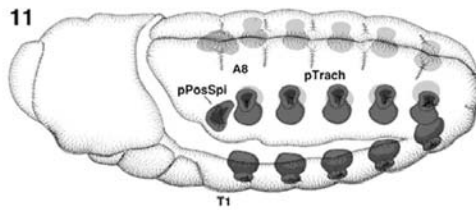
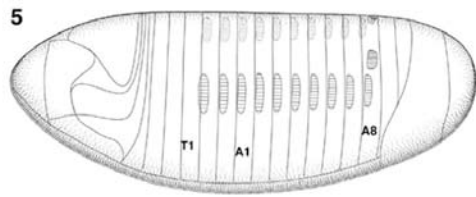
1. wave sensilla
2. wave sensilla
multidendritic neurons
larval photoreceptor (Bolwig's organ)
"proneural clusters"
sensillum precursors

Somatic Musculature

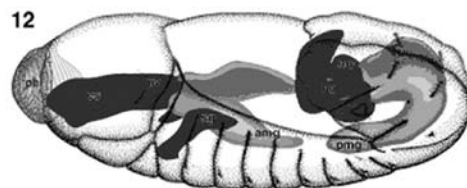
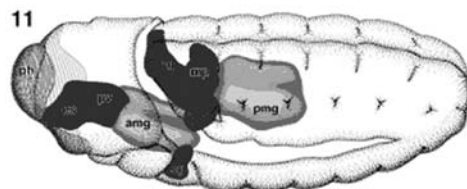
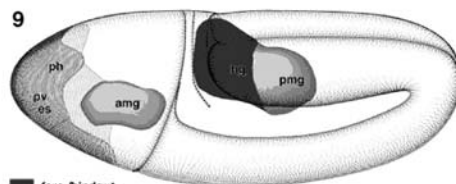
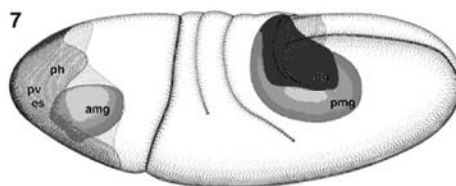
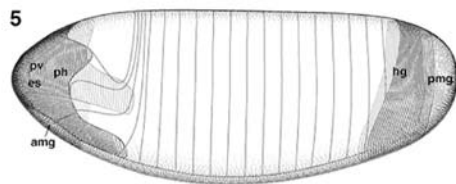


somatic mesoderm / musculature

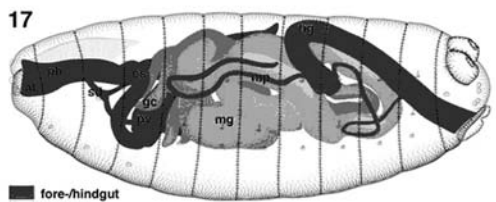
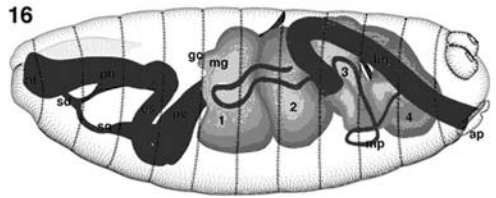
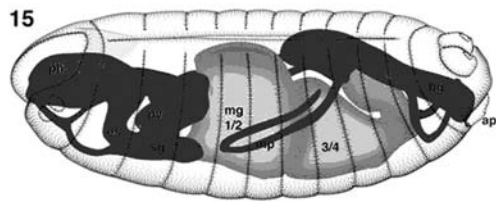
Tracheal System



Intestinal Tract

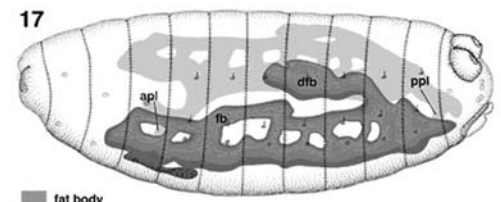
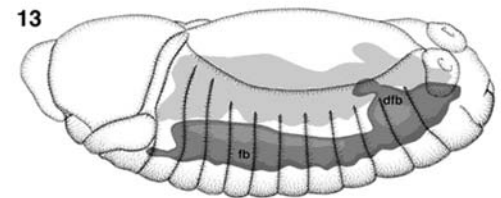
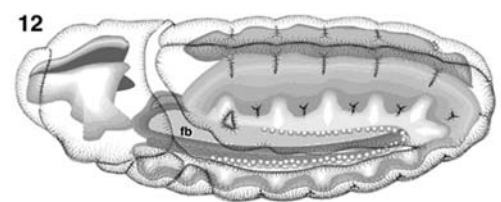


Intestinal Tract



■ fore-hindgut
■ midgut

Fat Body



■ fat body

(Tafeln aus „Atlas of *Drosophila* Development“, Volker Hartenstein, CSHL Press, 1993)

... auf Wiedersehen!