

## Erweiterungsmodul Genetik- Zoologie I WS 19/20

### Versuche

### Moderation und Technik

V1	Charakterisierung einer <i>Drosophila</i> -Mutante	A. Paululat / H. Harten
V2	<i>Drosophila</i> Handling, GFP-Fliegen	A. Paululat / M. Reinhardt
V3	S2 Zellfärbung	R. Schiemann / A. Buhr
V4	Das <i>lac</i> -Operon-Modell	K. Jahreis/K. Fänger
V5	Hefe-Glycolyse-Mutanten	J. Heinisch / A. Murra
V6	Transformation und Suppression bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J. Heinisch / A. Murra
V7	Tetradenanalyse	J. Heinisch / A. Murra
V8	Komplementationsanalyse (Hefe)	H.-P. Schmitz / S. Bartels
V9	Genetischer Fingerabdruck Schmecker-Test	K. Jahreis/K. Fänger
V10	Nachweis von Barr-Körperchen	A. Paululat
V11	Rasterelektronenmikroskopische Analyse ektopischer Augen in <i>Drosophila</i>	A. Paululat / W. Mangerich

### Klausurtermine:

1. Termin: 12.12.2019, ab 18.00h

Nachklausurtermin: 11.02.2020, ab 18.00h

# Erweiterungsmodul Genetik-Zoologie I WS 19/20

## PRAKTIKUM

### 1. Woche

#### Mo. 25. 11.19

10.00 - 10.30	AE Allgemeine Einführung und Sicherheitsbelehrung		A.P. / K.J.
10.30 - 13.30	V2 UAS-Gal4 (GFP-Fliegen)	Handling und Virg. sammeln	A.P. / M.R.
13.30 - 14.30	P a u s e		
14.30 - 18.00	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Isolierung genom. DNA, PCR	A.P. / H.H.
	V2 UAS-Gal4 (GFP-Fliegen)	Handling und Virg. sammeln	A.P. / M.R.

#### Di. 26.11.19

10.00 - 11.00	V4 <i>lac</i> -Operon	Einführung, Masterplatten	K.J. / K.F.
11.00 - 13.00	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Gele gießen	A.P. / H.H.
	V2 UAS-Gal4 (GFP-Fliegen)	Virg. sammeln	A.P. / M.R.
	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Gel starten	A.P. / H.H.
13.00 - 14.00	P a u s e		
14.00 - 15.00	S1 Seminar		
15.00 - 16.00	V5 Hefe-Glykolyse-Mutanten	Auftropfen	J.H. / A.M.
16.00 - 17.00	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Banden ausschneiden, Ligation	A.P. / H.H.
17.00 - 17.30	V2 UAS-Gal4 (GFP-Fliegen)	Virg. Sammeln	A.P. / M.R.

17.30 – 18.45

Vorlesung AP

#### Mi. 27. 11.19

10.00 - 12.30	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Transformation	A.P. / H.H.
12.30 - 13.30	P a u s e		
13.30 - 14.30	S2 Seminar		
14.30 - 16.00	V4 <i>lac</i> -Operon	Enzymtest, Auswertung	K.J. / K.F.
16.00 - 17.00	V2 UAS-Gal4 (GFP-Fliegen)	Virg. sammeln, Kreuz. ansetzen	A.P. / M.R.

17.00 – 18.30

Vorlesung AP

#### Do. 28. 11.19

13.00 - 14.00	V6 Transformation (Hefe)	kompetente Zellen	J.H. / A.M.
14.00 - 15.00	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Animpfen der Kolonien	A.P. / H.H.
15.00 - 16.00	V6 Transformation (Hefe)	TF, DNA-Zugabe	J.H. / A.M.
16.00 - 18.30	V7 Vorlesung JJH und Tetradenanalyse		Einführung,
Masterplates	J.H. / A.M.		
18.30 - 19.00	V6 Transformation (Hefe)	Ausplattieren	J.H. / A.M.

#### Fr. 29. 11.19

13.00 - 15.00	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	DNA-Isolierung, Restriktion	A.P. / H.H.
	V3 S2 Zellfärbung	Vorbereitung	R.S. / A.B.
15.00 - 16.30	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Agarosegel	A.P. / H.H.
	V3 S2 Zellfärbung	1. Antikörper	R.S. / A.B.
16.30 - 17.30	V7 Tetradenanalyse	Tetraden abstempeln	J.H. / A.M.
17.30 - 18.00	V1 <i>Drosophila</i> Mutante	Sequenzierung ansetzen	A.P. / H.H.

# Erweiterungsmodul Genetik-Zoologie I WS 19/20

## PRAKTIKUM

### 2. Woche

#### Mo. 02. 12.19

10.00 - 11.00	S3	Seminar		
11.00 - 11.30	V3	S2 Zellfärbung	2. Antikörper	R.S. / A.B.
11.30 - 13.00	V10	Nachweis von Barr-Körperchen		A.P.
13.00 - 14.00		P a u s e		
14.00 - 15.30	V9	Genetischer Fingerabdruck	DNA-Isolierung, PCR	K.J. / K.F.
15.30 - 16.30	V8	Komplementationsanalyse	Einführung, Animpfen	H.P.S. / S.B.
16.30 - 17.30	V7	Tetradenanalyse	Abstempeln	J.H. / A.M.
17.30 - 19.00		Vorlesung AP		

#### Di. 03. 12.19

10.00 - 11.00	S4	Seminar		
11.00 - 12.30	V8	Komplementationsanalyse	Kreuzung	H.P.S. / S.B.
12.30 - 13.30		P a u s e		
13.30 - 14.30	S5	Seminar		
14.30 - 16.30	V6	Vorlesung JJH und Transformation (Hefe) und Masterplates		Auswertung
16.30 - 17.00	V9	Genetischer Fingerabdruck	Restriktion	K.J. / K.F.
17.00 - 18.00	V3	S2 Zellfärbung	Waschen, Einbetten	R.S. / A.B.
18.00 - 18.30 (bzw. in Wartezeiten von V3)			V7 Demonstration Mikromanipulator	J.H.

#### Mi. 04. 12.19

10.00 - 11.00	V7	Tetradenanalyse	Auswertung Marker	J.H. / A.M.
11.00 - 12.00	V5	Hefe-Glykolyse-Mutanten	Auswertung + Theorie	J.H. / A.M.
12.00 - 13.00	V6	Hefetransformation	Auswertung	J.H. / A.M.
13.00 - 14.00		P a u s e		
14.00 - 14.30	V9	Genetischer Fingerabdruck	Agarosegel	K.J. / K.F.
14.30 - 16.30	V7	Tetradenanalyse	Markenkopplung + Theorie	J.H. / A.M.
16.30 - 18.00	V3	S2 Zellfärbung	Dokumentation	R.S. / A.B.

#### Do. 05. 12.19

13.00 - 14.00	V9	Genetischer Fingerabdruck	Auswertung	K.J. / K.F.
14.00 - 16.00	V2	UAS-Gal4 (GFP-Fliegen)	Auswertung	A.P. / M.R.
16.00 - 17.30	V8	Komplementationsanalyse	Auswertung	H.P.S. / S.B.
17.30 - 18.30	V1	<i>Drosophila</i> Mutante	Sequenz-Auswertung	A.P. / H.H.

#### Fr. 06. 12.19

13.00 - 14.30	V6	Hefetransformation	Auswertung	J.H. / A.M.
14.30 - 16.00	V11	Analyse ektopischer Augen	Rasterelektronenmikroskopie	A.P. / W.M.
16.00 - 17.00	V3	S2 Zellfärbung	Dokumentation	R.S. / A.B.
17.00 - 17.30		AUFRÄUMEN, ABSCHLUSSBESPRECHUNG		Dozenten

## **Versuch 1: Molekulare Charakterisierung einer *Drosophila*-Mutante**

### **1. Grundlagen**

Eine in *Drosophila* sehr häufig verwendete Methode zur Untersuchung von Entwicklungsvorgängen ist die sogenannte Mutantenanalyse.

Wenn wir fragen, welche Gene an der Entstehung bzw. der Erhaltung bestimmter Gewebe beteiligt sind, suchen wir zunächst nach Mutanten, bei denen die Bildung dieser Gewebe möglichst spezifisch unterbleibt oder verändert ist. Sobald eine solche Fliegenlinie identifiziert wurde, stellt sich die Frage, welches Gen in dieser Linie mutiert vorliegt und inwieweit diese Mutation die Entwicklung des jeweiligen Gewebes beeinträchtigt. In diesem Zusammenhang kann die molekulare Charakterisierung der Mutation wertvolle Informationen liefern.

### **2. Versuchsziel**

Ziel des Versuches ist es, eine Mutation in dem Gen *gartenzwerg* genauer zu charakterisieren. Insbesondere die Frage nach der Art der Mutation (Substitution, Deletion, Insertion, etc.) steht hierbei im Vordergrund.

Zur Bearbeitung der Fragestellung soll zunächst ein Teil des *gartenzwerg* Gens in einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) vervielfältigt werden, um anschließend die Mutation mit Hilfe von Sequenzierungen identifizieren zu können.

#### **1.3 Versuchsdurchführung**

Als Ausgangsmaterial des Versuches wird genomische DNA aus Fliegen einer Linie benötigt, die eine Mutation im *gartenzwerg* Gen trägt. Um diese DNA zu isolieren werden ca. 20 adulte Tiere in einem Extraktionspuffer zermahlen, wobei die genomische DNA freigesetzt wird. Nach dem Abzentrifugieren von Geweberesten kann die DNA mit Isopropanol aus der Lösung ausgefällt, gewaschen und in H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

### Präparation genomischer DNA:

1. Sammeln und betäuben Sie ca. 20 adulte Fliegen in einem 1,5ml Eppendorf Gefäß.
2. Geben Sie 200µl Puffer A zu und zermahlen Sie die Fliegen **gründlich** mit einem Pistill.
3. Geben Sie weitere 200µl Puffer A hinzu und homogenisieren Sie das Gewebe bis nur noch Kutikulareste übrigbleiben.
4. Inkubieren Sie die Proben für 30min bei 65°C im Inkubator/Wasserbad.
5. Geben Sie 700 µl frisch angesetzte LiCl/KAc Lösung ( 500 µl LiCl + 200 µl KAc ) zu den Ansätzen und inkubieren Sie die Proben für 10 min auf Eis.
6. Zentrifugieren Sie die Proben bei 14.000 x g für 15min (8°C). Anschließend überführen Sie 1ml des Überstandes in ein neues 1,5ml Eppendorf Gefäß. Vermeiden Sie Kontaminationen mit Geweberesten und Proteinen. Wenn nötig wiederholen Sie die Zentrifugation.
7. Geben Sie 600µl kaltes Isopropanol zu dem Ansatz und zentrifugieren Sie bei 14.000 x g für 15 min bei 10°C. Anschließend werfen Sie den Überstand und waschen das DNA Pellet in 330 µl 70-75% igem, eiskalten Ethanol. Zentrifugieren Sie erneut für 10min bei 14.000 x g und 10°C.
8. Nehmen Sie das Ethanol ab und lassen Sie die Pellets bei geöffnetem Deckel vollständig trocknen.
9. Resuspendieren Sie die getrockneten Pellets vorsichtig (kein mehrfaches Pipettieren) in 100 µl H<sub>2</sub>O.
10. Die vorliegende Lösung enthält die genomische DNA.

Im Folgenden wird die isolierte genomische DNA als Matrize (Template) in einer PCR eingesetzt.

### PCR Pipettierschema:

Stoff	Volumen
5 x PCR-Puffer	10 µl
dNTP-Mix+Polymerase(NEB-ONETaq)	4 µl
Primermix	2 µl
Template (genomische DNA)	2 µl
H <sub>2</sub> O	32 µl

### PCR-Temperaturprofil:

Prozess	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	30 sec
Denaturierung	94°C	15 sec
Annealing	59,5°C	15 sec <b>35x</b>
Elongation	68°C	2,5 min
Finale Elongation	68°C	5min

Im Anschluss an die PCR werden die kompletten Ansätze bei 100V einer Gelelektrophorese (1 % Agarose in TAE Puffer) unterzogen und anschließend auf einen UV-Tisch transferiert, wo die ihrer Größe entsprechend aufgetrennten DNA-Fragmente mittels UV-Anregung sichtbar gemacht werden können. Im Idealfall sollten lediglich jene DNA-Banden zu erkennen sein, deren Größe den Erwartungen entspricht (Wildtyp: 2300 Basenpaare, Mutante: 480 Basenpaare). Diese Fragmente werden mit Hilfe eines Skalpellens möglichst sauber aus dem Gel geschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend aus dem Gel herausgelöst.

### Gel-Extraktion:

1. Geben Sie 350 µl Binde-Puffer (gelb) zu dem Gelstück
2. Lösen Sie die Gelmatrix bei 50°C im Thermoschüttler auf (3-10 min)
3. Überführen Sie die komplette Lösung in eine der ausgeteilten Säulen
4. Zentrifugieren sie den Ansatz 1min bei 14.000 x g
5. Verwerfen Sie den Durchlauf und geben Sie 600 µl Waschpuffer auf die Säule, zentrifugieren Sie den Ansatz erneut (1min, 14.000 x g)

6. Verwerfen Sie den Durchlauf und zentrifugieren Sie den Ansatz erneut 1min, 14.000 x g (dieser Schritt ist essentiell, da dadurch die Säule getrocknet wird)
7. Transferieren Sie die Säule in ein neues, sauberes Reaktionsgefäß und geben Sie 30 µl H<sub>2</sub>O mittig auf die Säulenmatrix. Warten Sie 1min und zentrifugieren Sie erneut (1min, 14.000 x g)
8. Das erhaltene Eluat enthält die aus dem Gel herausgelöste DNA

#### Ligation:

Im nächsten Schritt wird die DNA in den Klonierungsvektor „pGEM-T easy“ ligiert, was die spätere Sequenzierung der jeweiligen DNA Fragmente erheblich erleichtert.

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

1 µl 10 x Ligationspuffer

1 µl Ligase

1 µl Vektor (pGEM-T easy)

7 µl ankonzentriertes Eluat der Gelextraktion (DNA)

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

#### Transformation:

An die Ligation schließt sich die Transformation, also das Einschleusen der Vektoren in Bakterienzellen an. Zunächst wird der Ligationsansatz mit 100µl chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen versetzt und anschließend 30 min lang auf Eis inkubiert. Es folgt eine 30 s Inkubation bei 42°C, der sogenannte Hitzeschock. Während dieser Zeit gelangen die Vektoren in die Zellen. Nun schließt sich eine weitere Inkubation auf Eis an (5 min), nach deren Ablauf die Zellen mit 1ml LB-Medium versetzt und für 45-60min bei 37°C geschüttelt werden. Abschließend werden die Zellen kurz abzentrifugiert (3min, 2000 x g) und das überschüssige Medium verworfen. Im Rücklauf werden die Zellen vorsichtig resuspendiert und auf Selektionsplatten (LB-Ampicillin), die zuvor mit 8%igem X-Gal (25µl) und 1M IPTG (20µl) versetzt wurden, ausgestrichen. Am nächsten Morgen können die Zellen, die einen leeren Vektor aufgenommen haben (blaue Kolonien) von jenen unterschieden werden, die auch das Insert tragen (weiße Kolonien). Von den weißen Kolonien werden zwei in jeweils 5ml LB-Flüssigmedium überführt, das 100µg/ml Ampicillin enthält, und über Nacht in einem 37°C Schüttler inkubiert.

### Plasmidisolierung:

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

1. Abzentrifugieren der ü. N. Kultur (3ml, 2min, 3000 x g)
2. Resuspension des Pellets in 200µl P1
3. Zugabe von 200µl P2 (alkalische Lyse); Mischen erfolgt durch Invertieren
4. Zugabe von 280µl P3 (Neutralisierung, Ausfällung); erneut Invertieren
5. Abzentrifugieren des Präzipitats: 10min, 14000 x g
6. Überführen des Überstandes in vorgegebene Säulen (Dekantieren)
7. Zentrifugation der Säulen: 1min, 14000 x g, Durchlauf (DI) verwerfen
8. Zugabe von 600µl Waschpuffer; Zentrifugation (1min, 14000 x g), DI verwerfen
9. Erneute Zentrifugation zum Trocknen der Säule (1min, 14000 x g)
10. Säule in ein neues, sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
11. Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>O
12. Zentrifugation: 1min, 14000 x g

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

### Restriktionsverdau:

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

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

8µl DNA (Plasmidpräparation)

1µl 10x Restriktionspuffer

1µl Restriktionsenzym (Eco RI)

Der Ansatz wird nun 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel (1%ig) aufgetragen. Als positiv werden jene Präparationen eingestuft, bei denen auf

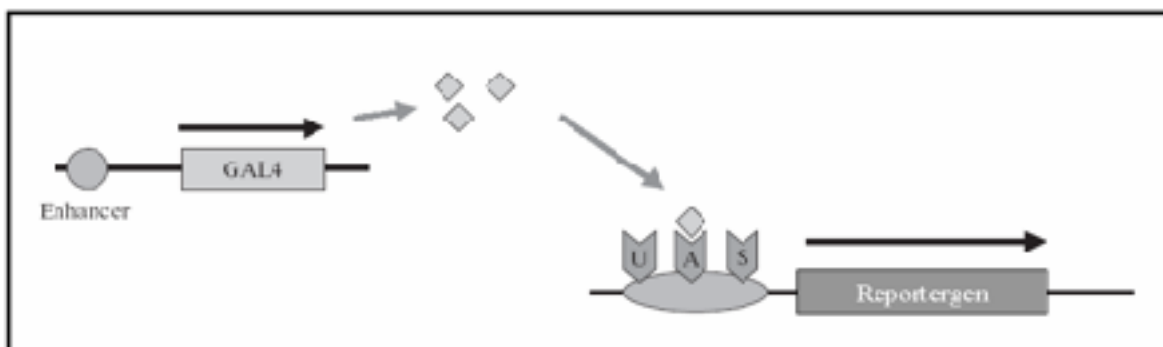
dem Gelbild sowohl eine Bande für den leeren Vektor als auch eine Bande für das herausgeschnittene Insert sichtbar werden. Diese Proben werden zwecks Sequenzierung verschickt. Basierend auf den erhaltenen Sequenzdaten kann eine eindeutige Charakterisierung der im *gartenzwerg* Gen vorliegenden Mutation vorgenommen werden.

## **Versuch 2: Ektopische Expression von Reporter genen in *Drosophila melanogaster* (UAS-Gal4-System)**

### **2.1 Grundlagen**

Um in *Drosophila* Gene ektopisch (d.h. außerhalb des endogenen zeitlichen oder räumlichen Expressionsmusters) zu exprimieren, macht man sich ein System aus der Hefe zunutze. Dabei wird in einen Fliegenstamm („Treiber“) ein Transgen eingebracht, welches für den Hefe-Transkriptionsfaktor „Gal4“ codiert, während in einem zweiten Stamm („Effektor“) das zu untersuchende Gen unter die Kontrolle einer sogenannten UAS („upstream activating sequence“) gebracht wird. Werden diese Stämme gekreuzt, kann Gal4 an die UAS binden und die Transkription des Zielgens aktivieren (Abb. 1). Dabei bestimmt der Gal4-Stamm das Muster der ektopischen Expression: Wird Gal4 im Herzen von Stadium 12-17 exprimiert, dann wird das durch die UAS kontrollierte Gen ebenfalls dort aktiviert. Gal4 kommt in wildtypischen Fliegen nicht vor und zeigt aus diesem Grund kaum unerwünschte Aktivitäten.

Um einen UAS-Stamm zu erzeugen, werden häufig komplette Transgene eingebracht, die zum einen als Reporter dienen (z.B. UAS-GFP, welches wir im Kurs verwenden), zum anderen aber auch einen Fehlexpressionsphänotyp verursachen können.

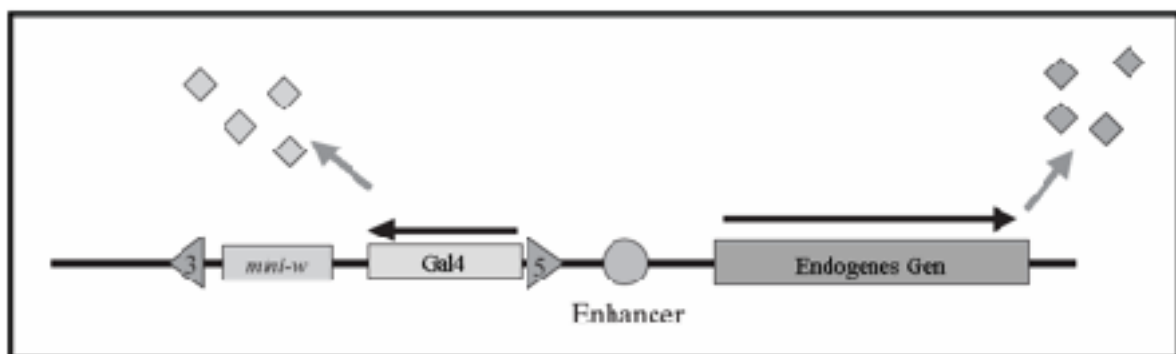


**Abbildung 1** Schematische Darstellung des im Kurs eingesetzten UAS-Gal4 Systems. Der Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 wird von einem endogenen *Enhancer* zeit- und gewebespezifisch aktiviert. Gal4 wiederum aktiviert durch die Bindung an eine *Upstream Activating Sequence (UAS)* die Transkription eines beliebigen Gens (im Kurs GFP) (verändert nach *Ryder und Russel, 2003*).

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

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

Bei einem Teil der im Kurs verwendeten Linien handelt es sich um sogenannte *Enhancer Trap* – Linien, also Fliegenlinien, in welche ein Transgen eingebracht wurde, das nur exprimiert wird, wenn es in der Nähe eines genomischen *Enhancers* inseriert. Das Expressionsmuster des auf dem P-Element kodierten *gal4* Gens wird dabei durch diesen genomischen *Enhancer* bestimmt. Durch Kreuzen der *Enhancer Trap* – Linien mit einer UAS – Reporterlinie kann die Expression des *gal4* Gens und somit die Aktivität des unbekanntes *Enhancers* visualisiert werden (Abbildung 2).



**Abbildung 2** Schematische Darstellung eines *Enhancer Trap* Experiments. Das verwendete P-Element trägt einen Transformationsmarker (*white* Gen, *mini-w*) sowie das *gal4* Gen, das unter der Kontrolle eines schwachen basalen Promotors steht. Dieser Promotor ist allerdings nicht in der Lage, die *gal4*-Transkription zu aktivieren. Insetiert das P-Element im Verlauf der Keimbahntransformation in der Nähe eines genomischen, endogenen *Enhancers*, kann dieser die Gal4 Expression aktivieren. Dabei folgt die Expression von Gal4 dem zeitlichen und gewebespezifischen Expressionsmuster jenes Gens, das von dem entsprechenden *Enhancer* reguliert wird (verändert nach *Ryder und Russel, 2003*).

## 2.2 Versuchsdurchführung

### Benötigte Materialien:

- virginelle Weibchen der UAS-Linien (UAS-eGFP, UAS-DsRED)
- adulte Männchen der Gal4-Linien (*hand*-Gal4, *mef2*-Gal4, *sgs*-Gal4, *repo*-Gal4, *actin*-Gal4)
- kleine Fliegenflaschen zum Aufbewahren der virginellen Weibchen
- feine Pinzetten
- Objektträger mit Deckgläschen
- Fluoreszenzmikroskop

### **Erste Woche:**

Es sollen virginelle Weibchen der Linien UAS-eGFP bzw. UAS-DsRED (Effektorlinien) mit Männchen verschiedener Gal4-Linien (Treiberlinien) gekreuzt werden (P-Generation). Die Nachkommen (3. Larven der F1-Generation) werden präpariert und die jeweils fluoreszierenden Gewebe mit Hilfe eines Binokulars bzw. Mikroskops dokumentiert. Sowohl die zeit- als auch die ortsspezifische Lokalisation der jeweiligen Fluoreszenz ist von Interesse.

Virginelle Weibchen sammeln: An jedem Kursmorgen werden zunächst die UAS-Fliegen auf frisch geschlüpfte Weibchen durchgesehen. Die Tiere aus der Flasche werden betäubt (Ether) und die virginellen Weibchen unter dem Binokular aussortiert und in kleinen Flaschen aufgehoben (man erkennt sie an der hellen Körperfarbe, meist schimmert der Darminhalt am Bauch durch). Die Flaschen müssen anschließend komplett frei von adulten Tieren sein! Im Laufe des Tages werden zweimal weitere geschlüpfte Weibchen gesammelt: Einmal mittags, einmal abends. Dabei können alle Weibchen als virginell eingestuft werden, da die Spermien von frisch geschlüpfte Männchen erst nach 6-8 Stunden gereift sind (Voraussetzung: Am Morgen sind alle adulten Tiere aus der Flasche entfernt worden!)

Fliegen entwickeln lassen: Am Donnerstag werden zu den virginellen Weibchen Männchen der jeweiligen Gal4-Linien gesetzt und die Entwicklung der F1-Generation abgewartet. In diesem Zusammenhang ist darauf zu achten, dass mehrere individuelle Kreuzungen angesetzt werden und dass pro Kreuzung jeweils nur eine UAS- und eine Gal4-Linie eingesetzt wird.

Ab Dienstag (2. Woche) werden die Flaschen auf das Vorhandensein von 3. Larven hin untersucht.

### **Zweite Woche:**

Präparation der Larven: Sobald 3. Larven vorhanden sind, können diese zur Präparation herangezogen werden, was auch an den folgenden Tagen der Woche geschehen soll. Die präparierten Gewebe, die nun die jeweiligen Fluoreszenzmarker exprimieren sollten, werden als sogenannte „Frischpräparate“ vorbereitet, unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und dokumentiert.

## **Versuch 3: Immuncytochemische Detektion von Proteinen in Schneider-2 Zellen**

### **1. Allgemeine Grundlagen**

Eine wesentliche Voraussetzung für die funktionelle Analyse eines Proteins liegt darin, die Position des entsprechenden Faktors sowohl auf Gewebe- als auch auf Zellebene bestimmen zu können. Insbesondere die subzelluläre Lokalisation, also die Verteilung des Protein innerhalb einer Zelle, ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung, da sie bereits erste Hinweise auf die *in vivo* Funktion des jeweiligen Proteins beinhalten kann. Neben der Analyse anhand von Gewebepreparationen bzw. entsprechend vorbehandelter kompletter Organismen, werden subzelluläre Lokalisationsstudien häufig an Zellkulturen durchgeführt, die man zuvor aus dem entsprechenden Wirtstier isoliert hat. Da einige Zelltypen dazu in der Lage sind, außerhalb ihres endogenen Gewebeverbandes zu überleben und sich darüber hinaus auch teilen und somit vermehren, kann eine einmal erzeugte Zellkultur über einen langen Zeitraum hinweg in Nährmedium kultiviert werden. Bei Bedarf können die Zellen für verschiedene Ansätze, wie beispielsweise die Expression ektopischer oder die Lokalisierung endogener Proteine herangezogen werden. Im Vergleich zu kompletten Geweben haben Zellkulturen den Vorteil, dass die Antikörper, die das gesuchte Protein markieren, direkten Zugang zu den Zellen haben und nicht erst durch in der Umgebung befindliche Zellen hindurch diffundieren müssen. Darüber hinaus stellen die faktisch unlimitierte Menge an Kulturzellen sowie deren relativ einfache Handhabung erhebliche Vorteile dar.

In dem vorliegenden Versuch soll die subzelluläre Lokalisation verschiedener *Drosophila* Proteine in Schneider-2 (S2) Zellen, die embryonalen Ursprungs sind, bestimmt werden. In diesem Zusammenhang werden proteinspezifische Antikörper eingesetzt, die ihr jeweiliges Zielprotein erkennen, daran binden und anschließend über Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden können.

Die Visualisierung der Bindung findet im Anschluss mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie statt.

## 2. Vorbereitung der Zellen

Jede Gruppe erhält zwei Deckgläschen, auf denen sich kultivierte S2 Zellen befinden. Die Gläschen werden zunächst mit den Zellen nach oben weisend in eine mit Parafilm ausgelegte Petrischale überführt, in der die nachfolgenden Inkubations- bzw. Waschschriffe stattfinden.

## 3. Fixierung und Immunfärbung

Folgende Schritte sind durchzuführen:

- 30 min fixieren mit 3 % PFA in PBS (ca. 100 µl pro Gläschen; Pipettenspitze möglichst immer an der gleichen Stelle des Gläschens ansetzen)
- Fixierlösung abnehmen; 3x kurz waschen (zugeben und direkt wieder abnehmen) mit PBS
- 20 min inkubieren mit 2 % BSA; 0,1 % Triton in PBS (dient dem Blockieren unspezifischer Bindestellen sowie der Permeabilisierung der Zellen)
- 1. Antikörper in PBS verdünnen und über Nacht bei 4°C inkubieren
- 3x kurz waschen mit PBS
- 60 min blockieren in Roti ImmunoBlock
- 3x kurz waschen mit PBS
- 2. Antikörper in PBS verdünnen und über Nacht bei 4°C inkubieren
- 3x je 10 min waschen mit PBS

Nach dem letzten Waschen sollte das PBS komplett abgenommen und je ein Tropfen Einbettmedium auf die Gläschen geben werden. Abschließend einen Objektträger auf die Deckgläschen legen und beim Umdrehen die Gläschen vorsichtig von dem darunter liegenden Parafilm lösen.

Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops.

## **Versuch 5: Phänotypische Analyse von *Drosophila*-Mutanten**

### **5.1 Grundlagen**

*Drosophila melanogaster* stellt seit mehreren Jahrzehnten einen der bekanntesten Modellorganismen dar. Eine Erklärung für diese Tatsache liegt unter anderem darin, dass viele Mutationen im Erbgut der Fliege die Ausbildung von charakteristischen Phänotypen, also sichtbaren Veränderungen im Erscheinungsbild des Organismus, zur Folge haben. Auf Basis dieser Phänotypen können häufig Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der mutierten Gene gezogen werden. Eine Voraussetzung für die sichere Identifizierung der Phänotypen ist eine profunde Kenntnis der äußeren bzw. inneren Körperstrukturen der Fliegen, da u.a. die Beschaffenheit der Körperanhänge, der Borsten, der Augen oder auch der Flügel bzw. der Flügeladern durch Mutationen in bestimmten Genen auf charakteristische, zum Teil aber auch sehr subtile Art und Weise verändert sein kann.

### **5.2 Versuchsziel**

In diesem Versuch sollen verschiedene *Drosophila* Linien, die jeweils eine Mutation in einem individuellen Gen tragen, phänotypisch untersucht werden. Auf Basis der beobachteten Phänotypen sollen die jeweiligen Linien gruppiert und die Funktionen der mutierten Gene mit den individuellen phänotypischen Ausprägungen in Korrelation gesetzt werden. Denkbare Gruppierungen wären beispielsweise:

1. Mutationen, die Morphologie bzw. die Farbgebung des Auges betreffend
2. Mutationen, die Morphologie der Flügel betreffend
3. Mutationen, die Größe der Tiere betreffend
4. usw.

Die jeweiligen Phänotypen sollen mit Hilfe von Stereomikroskopen sowie Digitalkameras dokumentiert werden.

### 5.3 Versuchsdurchführung

Die ausgeteilten Fliegen werden mit Hilfe eines Stereomikroskops auf auffällige Phänotypen hin untersucht. Als Referenz dient eine ebenfalls zur Verfügung gestellte wildtypische Linie (white). Insbesondere Form und Farbe der Augen bzw. die Flügelmorphologie sollten genauer betrachtet werden.

Benötigte Materialien:

- Fliegenflaschen mit den jeweiligen Linien
- Pinsel, Objektträger
- Federstahlpinzette
- Stereomikroskop

#### Analyse der Phänotypen:

Die adulten Tiere werden analog zu Versuch 3 mit Ether betäubt und auf einen Objektträger bzw. ein Stück Papier transferiert. Mit Hilfe einer Federstahlpinzette werden die Tiere unter einem Stereomikroskop so ausgerichtet, dass etwaige morphologische Abweichungen optimal zu erkennen sind. Eindeutige Phänotypen werden mit Hilfe von Digitalkameras dokumentiert.

#### Verwendete Linien:

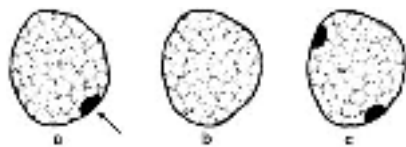
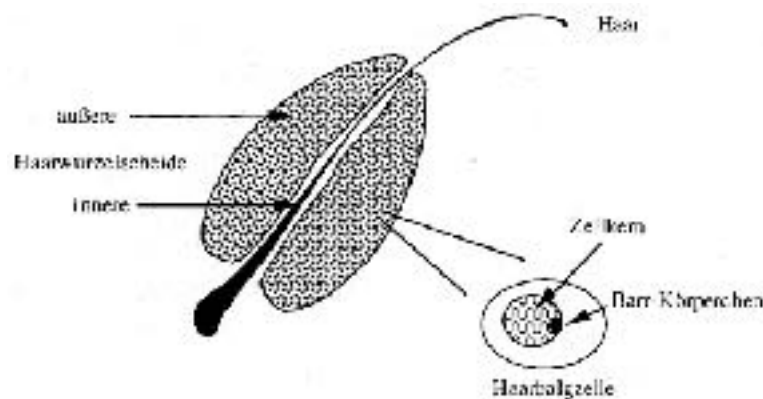
- Bar (B)
- ebony (e)
- Glazed (Gla) / Curly (Cy)
- vestigial (vg)
- yellow (y)
- scarlet (st)
- Drop (Dr)
- Tubby (Tb)
- Su(z)2
- white (w)

## Versuch 10: Nachweis kondensierter X-Chromosomen beim Menschen / Barr-Körperchen

Die kondensierten X-Chromosomen (Thema: Gendosiskompensation) lassen sich in Haarbalgzellen oder in Mundschleimhautzellen nachweisen. Mit Hilfe einer Chromatinfärbung werden die nach ihrem Entdecker benannten „Barr-Körperchen“ sichtbar gemacht.

### Experimentelle Durchführung

Mit Hilfe eines Wattestäbchens oder Spatels werden Mundschleimhautzellen von der Zunge geschabt und auf einen Objektträger übertragen. Durch Zugabe eines Tropfens Orcein-Essigsäure wird die Färbung des Chromatins eingeleitet. Nach 1. Minute hält man den Objektträger für 15-20 Sek. über die Sparflamme eines Bunsenbrenners. Dabei darf die Färbelösung nicht kochen und das Präparat auch nicht eintrocknen. Mit Hilfe einer Pipette wird die Färbelösung vorsichtig abgezogen und die Zellen zweimal kurz mit 45% Essigsäure gewaschen. Dazu Essigsäuretropfen auf die Zellen geben, 30 Sek. warten, absaugen und den Waschvorgang wiederholen. Nach dem letzten Absaugen wird das Präparat mit 2-3 Tropfen 45%iger Essigsäure bedeckt und ein Deckglas aufgelegt. Anschließend leichten Druck auf das Deckglas ausüben (= Quetschpräparat). Anstelle von Mundschleimhautzellen können auch Haarwurzelzellen entsprechend der Anleitung präpariert werden. Mit Hilfe eines Stereomikroskops werden dazu ausgerissene Haare auf das Vorhandensein der Haarwurzelscheidenzellen überprüft. Das Haar wird über der Wurzelscheide abgeschnitten und in einen Tropfen Orcein-Essigsäure (auf einem Objektträger) gelegt. Danach verfährt man wie oben beschrieben.



**Barr-Körperchen:** a Zelle einer Frau, b Zelle eines Mannes, c Zelle eines Menschen mit drei X-Chromosomen. Barr-Körperchen sind als dunkle Bereiche (Pfeil) zu erkennen, Bild: Copyright Spektrum Akademischer Verlag

### Auswertung

Identifizieren Sie die Barr-Körperchen in etwa 40-50 Zellkernen. Sind in allen Zellen Barr-Körperchen zu sehen? Stellen Sie eine Statistik auf.

Anmerkung: ggf. Färbedauer variieren

## **Versuch 11: Histochemischer Nachweis von X-Gal in transgenen Fliegen**

### **11.1 Versuchsdurchführung**

1. Mit einer Federstahlpinzette werden möglichst große Wanderlarven von der Gefäßwand abgesammelt und kurz in 60 °C warmes Wasser getaucht (2 Sek). Die Tiere strecken sich dabei und lassen sich im Anschluss besser präparieren.
2. Larven in einem Blockschälchen mit vorgelegtem Drosophila-Ringer (=DR-Puffer) aufpräparieren. Nur gut zugängliches Gewebe wird fixiert und zeigt später eine Färbung. Unter dem Stereomikroskop können natürlich einzelne Organe, z.B. Gonaden, Imaginalscheiben etc., freipräpariert werden. Die präparierten Larven überführt man in ein zweites Blockschälchen (gefüllt mit PBS) bis genügend Material für die eigentliche Färbung bereitsteht.
3. Nun Larven in 0,75 % Glutaraldehyd-Lösung (in PBS) für mind. 15 min fixieren. Eventuell Fixierdauer erweitern (max. 30 min). Während des Fixierens leicht schwenken.
4. Larven in Puffer B überführen, schwenken und Lösung tauschen (Glutaraldehyd auswaschen).
5. Reaktion durch Zugabe von 40 µl 10%igem X-Gal starten.
6. Inkubation bei RT oder 37 °C im Dunkeln. Die Färbedauer beträgt Minuten bis Stunden und kann gelegentlich unter dem Stereomikroskop kontrolliert werden.
7. Organe zweimal (oder öfters) in PBS waschen, in einem geeigneten Medium (Polyvinylalkohol, Mowiol®) auf einem Objektträger einbetten und für die folgende Mikroskopie beiseite legen.

Benötigte Lösungen:

**DR-Puffer**

130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Puffer A:**

10 mM Natriumphosphat, pH7

150 mM NaCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

**Puffer B**

10 ml Puffer A + 100 µl 330mmol Kaliumhexacyanidoferrat(II) (gelbes Blutlaugensalz)

+ 100 µl 330mmol Kaliumhexacyanidoferrat(III) (rotes Blutlaugensalz)

**Glutaraldehyd**

**10 %ige X-Gal-Lösung in DMF (Dimethylformamid)**