

Biologie

**Die Bedeutung der Extrazellulären Matrix und sezernierter Signalmoleküle  
für die axonale Wegfindung in *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Jens Hillebrand  
aus Iserlohn

- 2004 -

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Janning
Tag der mündlichen Prüfung:	13. September 2004
Tag der Promotion:	22. Oktober 2004

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. DIE ENTWICKLUNG DES EMBRYONALEN ZNS VON <i>DROSOPHILA</i> .....	1
1.1.1. Frühe Entwicklung des ZNS .....	2
1.1.2. Die Entwicklung des Axonmusters .....	3
1.2. NETRIN .....	4
1.2.1. NETRIN in <i>Drosophila</i> .....	6
1.2.2. NETRIN-Rezeptoren.....	7
1.2.3. Die Funktion des NETRIN-Signals.....	8
1.3. SLIT.....	10
1.3.1. SLIT in <i>Drosophila</i> .....	12
1.3.2. SLIT-Rezeptoren.....	13
1.4. DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (ECM).....	14
1.4.1. ECM in <i>Drosophila</i> .....	16
1.5. ZIEL DER ARBEIT .....	17
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
2.1. MATERIAL .....	18
2.1.1. Chemikalien .....	18
2.1.2. Puffer, Medien und Lösungen.....	18
2.2. VEKTOREN .....	25
2.2.1. Verwendete cDNAs .....	25
2.2.2. Verwendete Oligonukleotide.....	25
2.2.3. Bakterienstämme .....	25
2.2.4. Antikörper.....	26
2.2.4.1. Primäre Antikörper .....	26
2.2.4.2. Sekundäre Antikörper.....	26
2.2.5. Verwendete Fliegenstämme .....	27
2.2.5.1. Balancer- und Wildtypstämme .....	27
2.2.5.2. Verwendete Deletions- und Einzelmutationen.....	28
2.2.5.2.1. X-chromosomale Mutanten .....	28
2.2.5.2.2. Zweitchromosomale Mutanten .....	29
2.2.5.2.3. Drittchromosomale Mutanten .....	29
2.2.5.3. GAL4 Aktivatorlinien.....	30
2.2.5.4. UAS Effektorlinien und EP-Linien.....	30
2.3. METHODEN .....	32
2.3.1. Genetische Methoden.....	32
2.3.1.1. Fliegenzucht.....	32
2.3.1.2. Sammeln von Embryonen .....	32
2.3.1.3. Keimbahntransformation .....	33
2.3.1.3.1. Präparation der Embryonen .....	33
2.3.1.3.2. Injektion der Embryonen.....	33

## Inhaltsverzeichnis

2.3.1.3.3.	Selektion transgener Fliegen .....	34
2.3.1.3.4.	Lokalisation der Insertionen .....	34
2.3.2.	Histologische Methoden .....	34
2.3.2.1.	<i>whole mount</i> Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> Embryonen .....	34
2.3.2.1.1.	Antikörperfärbung von Einzelablagen .....	34
2.3.2.1.2.	Antikörperfärbung von Massen-Eiablagen (Hummel et al., 1997) .....	36
2.3.2.2.	Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben .....	37
2.3.2.3.	Antikörperspezifische Nachweisreaktionen .....	38
2.3.2.3.1.	Alkalische Phosphatase (AP) Färbung .....	38
2.3.2.3.2.	Meerrettichperoxidase (HRP) Färbung .....	38
2.3.2.3.3.	Präabsorption des anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörpers .....	38
2.3.2.4.	<i>whole mount in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Embryonen .....	39
2.3.2.4.1.	Fixierung der Embryonen .....	39
2.3.2.4.2.	Hybridisierung der Embryonen .....	40
2.3.2.4.3.	Nachweisreaktion .....	40
2.3.2.4.4.	Einbetten der Embryonen .....	41
2.3.3.	Molekularbiologische Methoden .....	41
2.3.3.1.	Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde .....	41
2.3.3.2.	Herstellung elektrokompenter Zellen (XL-1blue oder DH5-alpha <i>Escherichia coli</i> ) .....	42
2.3.3.3.	Bakterientransformation (Elektrotransformation) .....	42
2.3.3.4.	DNA Restriktionen .....	43
2.3.3.5.	Gelelektrophorese .....	43
2.3.3.6.	Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel .....	43
2.3.3.7.	Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen .....	43
2.3.3.8.	Ligation von DNA Fragmenten .....	44
2.3.3.9.	Mini-Präparation von Plasmid DNA .....	44
2.3.3.10.	Midi-Präparation von Plasmid DNA .....	45
2.3.3.11.	Standard PCR .....	45
2.3.3.12.	Sequenzierung .....	46
2.3.4.	Biochemische Methoden .....	46
2.3.4.1.	Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten .....	46
2.3.4.2.	Gewinnung von Schneiderzell Proteinextrakten .....	47
2.3.4.3.	Konzentrationsbestimmung und Vorbereitung von Proteinextrakten für die Gelelektrophorese 47	
2.3.4.4.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	48
2.3.4.5.	Western-Blotting und Immunodetektion von Proteinen .....	48
2.3.5.	Zellkultur .....	49
2.3.5.1.	Kultivierung von S2 Zellen .....	49
2.3.5.2.	Antikörperfärbung an S2 Zellen .....	49
2.3.5.3.	Transfektion von S2 Zellen .....	49
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
3.1.	EXTRAZELLULÄRE MATRIX (ECM) .....	51
3.1.1.	Phänotypische Charakterisierung von ECM-Mutanten .....	51
3.1.1.1.	RNAinterference .....	54

## Inhaltsverzeichnis

3.1.2.	Ektopische Expression von ECM-Proteinen.....	55
3.1.3.	Matrix-Metalloproteasen als ECM modifizierende Proteine .....	57
3.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES NETRIN-PROTEINS IN DER NEURONALEN ENTWICKLUNG VON <i>DROSOPHILA</i> .....	59
3.2.1.	NETRIN in <i>Drosophila</i> .....	59
3.2.2.	NETRINA-TM.....	59
3.2.2.1.	Klonierung von <i>NetrinA-TM</i> .....	60
3.2.2.2.	Ektopische Expression von NETA-TM .....	60
3.2.2.2.1.	Auszählung der Defekte nach ektopischer NETA-TM Expression.....	62
3.2.3.	Klonierung eines Epitop-markierten NETA-TM Protein.....	63
3.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES SLIT-PROTEINS IN DER NEURONALEN ENTWICKLUNG VON <i>DROSOPHILA</i> .....	64
3.3.1.	SLIT-Expression .....	64
3.3.2.	Phänotypische Charakterisierung der Mutation <i>slit</i> <sup>B1-32</sup> .....	65
3.3.2.1.	Western-Blot-Analyse der SLIT-Expression in der Mutation <i>slit</i> <sup>B1-32</sup> .....	66
3.3.3.	Klonierung eines Epitop-markierten SLIT-Proteins .....	67
3.3.3.1.	Klonierungsstrategie .....	67
3.3.3.2.	Expression in <i>Drosophila</i> S2-Zellen .....	68
3.3.3.3.	Etablierung transgener UAS- <i>slit-myc</i> Fliegen.....	69
3.3.3.4.	Ektopische Expression von UAS- <i>slit-Myc</i> .....	69
3.3.3.4.1.	Test der UAS- <i>slit-myc</i> Stämme .....	69
3.3.3.4.2.	Rettung des <i>slit</i> <sup>B1-32</sup> Phänotyps durch UAS- <i>slit-myc</i> .....	70
3.3.3.4.3.	Ektopische Verteilung von SLIT-MYC .....	71
3.3.3.4.4.	Defekte in der ZNS Organisation nach ektopischer SLIT-MYC-Expression .....	73
3.3.4.	Klonierung eines transmembrangebundenen <i>slit-myc</i> -Konstruktes.....	74
3.3.4.1.	Klonierungsstrategie .....	75
3.3.4.2.	Expression von SLIT-MYC-TM in <i>Drosophila</i> S2-Zellen.....	76
3.3.4.3.	Etablierung transgener UAS- <i>slit-myc-TM</i> Fliegen .....	76
3.3.4.4.	Ektopische Expression von UAS- <i>slit-myc-TM</i> .....	76
3.3.4.4.1.	Test der UAS- <i>slit-myc-TM</i> Stämme.....	77
3.3.4.4.2.	Rettung des mutanten Phänotyps durch SLIT-MYC-TM.....	77
3.3.4.4.3.	Verteilung ektopischer SLIT-MYC-TM- Expression .....	78
3.3.4.4.4.	Phänotypische Charakterisierung nach ektopischer SLIT-MYC-TM- Expression .....	80
3.3.5.	Vergleichende Expressionsstudien von SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM .....	80
3.3.5.1.	Ektopische Expression der SLIT-Konstrukte in Flügelimaginalscheiben .....	80
3.3.5.1.1.	Ektopische Expression von SLIT-MYC in Flügelimaginalscheiben .....	81
3.3.5.1.2.	Ektopische Expression von Slit-Myc-TM in Flügelimaginalscheiben .....	82
3.3.5.1.3.	3D Rekonstruktion.....	82
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
4.1.	ECM .....	84
4.1.1.	Phänotypische Analyse von ECM-Mutanten .....	85
4.1.2.	Ektopische Expression .....	89
4.1.2.1.	Interaktionen von Integrinen und Proteoglycanen mit SLIT.....	90

## Inhaltsverzeichnis

4.2.	SLIT .....	91
4.2.1.	SLIT-Konstrukte .....	92
4.2.1.1.	SLIT-MYC- und SLIT-MYC-TM-Expression in Schneider-Zellen .....	92
4.2.1.2.	Ektopische Expression von SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM .....	93
4.2.1.2.1.	Embryonale Überexpression mittels <i>en</i> -Gal4 .....	94
4.2.1.2.2.	Embryonale Überexpression mittels <i>elav</i> -Gal4 und <i>rho</i> -Gal4 .....	95
4.2.1.2.3.	Embryonale Überexpression mittels <i>slit</i> -Gal4 und <i>sim</i> -Gal4 .....	96
4.2.1.2.4.	Ektopische Expression in der Flügelimaginalscheibe .....	97
4.2.2.	Vesikuläre SLIT-Expression .....	98
4.2.3.	Matrix-Metallo-Proteasen .....	100
4.3.	NETRIN .....	102
4.3.1.	Ektopische Expression von NETA-TM .....	102
4.3.1.1.	Ektopische NETA-TM-Expression im Hintergrund der Defizienz <i>Df(1)KA 9</i> .....	103
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASUNG .....</b>	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>120</b>

## 1. Einleitung

Die Funktion aller adulten zentralen Nervensysteme (ZNS) basiert auf der Wechselwirkung eines enorm komplexen neuronalen Netzwerks. Die Grundlage dieser Komplexität wird bereits in der Embryonalentwicklung angelegt. Hierbei ist die korrekte Verknüpfung zwischen Neuronen und ihren Ziel-Zellen von entscheidender Bedeutung. Während der Entwicklung des embryonalen ZNS wandern die Axone einzelner Neurone über weite Strecken zu ihrem spezifischen Ziel. Dabei werden die Axone von verschiedensten Signalen navigiert (Dickson, 2002). Diese unterteilt man grob in attraktive und repulsive Signale, sowie in Signale die über große Distanz ("long range" Signale) und über kurze Distanz wirken ("short range" Signale). Eine wichtige Struktur für die Navigation der wandernden Axone stellt der sogenannte Wachstumskegel dar. Als "leading edge" der Axone dient er als eine Art Sensor, der Signale der Umgebung detektiert und interpretiert.

Für die Analyse der zellulären Wechselwirkungen der axonalen Wegfindung, die die Ausbildung der komplexen Strukturen des ZNS ermöglichen, dient *Drosophila* als Modellsystem. Zur Untersuchung dieser Vorgänge eignet sich *Drosophila* hervorragend, da die Komplexität des einfachen Strickleiter-Nervensystems vergleichsweise niedrig ist und die zelluläre Morphologie und Entwicklung des zentralen Nervensystems im Detail bekannt sind (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Weiterhin stehen viele genetische und molekularbiologische Analysemethoden zur Verfügung.

### 1.1. Die Entwicklung des embryonalen ZNS von *Drosophila*

Das embryonale zentrale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* besteht aus den beiden Hirnhemisphären der Kopfregion und dem ventralen Bauchmark, welches sich aus segmentalen Ganglien, den Neuromeren, zusammensetzt. Die Hauptaxonbahnen des Bauchmarks sind in einem regelmäßigen, strickleiterähnlichen System organisiert. Diese komplexe dreidimensionale Struktur des ZNS entwickelt sich aus der sogenannten neurogenen Region des ventrolateralen Ektoderms (dem Neuroektoderm) sowie dem Mesektoderm. In der Embryogenese des ZNS entstehen aus den Zellen des Neuroektoderms Neurone und Gliazellen. Bei den Zellen des

Mesektoderms handelt es sich um Vorläuferzellen der sogenannten Mittellinie des ZNS (Campos-Ortega, 1993; Goodman and Doe, 1993).

### 1.1.1. Frühe Entwicklung des ZNS

Das Neuroektoderm wird im zellulären Blastoderm angelegt. Die Zellen des frühen Neuroektoderms besitzen alle eine neuronale Kompetenz. Erst über laterale Inhibition werden neuronale und epidermale Zellen determiniert. Diese neuronalen Vorläuferzellen des ZNS sind die sogenannten Neuroblasten. In der Gastrula, nach der Invagination des Mesoderms, delaminieren diese Zellen der neurogenen Region ins Innere des Embryos. Pro Hemisegment delaminieren 30 Neuroblasten, aus denen in der weiteren Embryogenese etwa 350 Neurone und 30 Gliazellen hervorgehen, deren Zellstammbäume vollständig beschrieben sind (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Aus den unterschiedlichen Neuroblasten entstehen entweder ausschließlich Neurone (Neuroblast), Neurone und Gliazellen (Neuro-Glioblast) oder ausschließlich Gliazellen (Glioblast). Alle Neuroblasten können entsprechend ihrer Nachkommenschaft einer dieser drei Kategorien zugeordnet werden (Bossing and Technau, 1994; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997).

Weitere Zellen des ZNS entstehen aus dem Mesektoderm. Diese Zellen bilden die Vorläuferzellen der sogenannten Mittellinie. Im Blastodermstadium finden sich die Zellen des Mesektoderms in zwei lateralen Zellreihen, welche das präsumptive Mesoderm und die neurogene Region voneinander trennen (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988). Die Zellen werden durch die Expression des bHLH Transkriptionsfaktors *single-minded* (*sim*) spezifiziert, welches die Transkription aller Mittelliniengene steuert (Nambu et al., 1990; Nambu et al., 1991).

Nach der Invagination des Mesoderms in der Gastrula kommen die beiden Zellreihen des Mesektoderms in der ventralen Mittellinie in Kontakt und bilden eine durchgehende Zellreihe von sieben bis acht Vorläuferzellen pro Segment (Bossing and Technau, 1994; Foe, 1989; Klämbt et al., 1991). In der weiteren Entwicklung wandern diese Vorläuferzellen ins Innere des Embryos, und zwar in die gleiche Ebene wie die Neuroblasten. Aus den Mittellinienvorläuferzellen differenzieren sich 26 Mittellinienzellen pro Hemisegment, bestehend aus bis zu vier Mittelliniengliazellen sowie verschiedenen Neuronen (Bossing and Technau, 1994;



Jacobs and Goodman, 1989; Klämbt et al., 1991). Die Neurone der Mittellinie lassen sich in die MP1-, UMI- und die VUM-Neurone, sowie die Nachkommen des medianen Neuroblasten (MNB) unterteilen. Die Gruppe der VUM-Neurone setzt sich aus Moto- und Interneuronen zusammen, deren Axone über die anteriore und posteriore Kommissur in die Peripherie projizieren (Bossing and Technau, 1994). Bei der Ausbildung der regelmäßigen Struktur des ZNS spielen die Zellen der Mittellinie des Nervensystems eine entscheidende Rolle (Lüer et al., 1997; Menne et al., 1997).

### **1.1.2. Die Entwicklung des Axonmusters**

Die Axonogenese beginnt in *Drosophila* nach etwa acht bis neun Stunden der Embryonalentwicklung (Klämbt et al., 1991). Die Hauptaxonbahnen des ZNS sind in einem regelmäßigen, strickleiterähnlichen System organisiert. Die abdominalen und thorakalen Neuomere sind jeweils longitudinal durch Konnektive verbunden. Je zwei segmentale Kommissuren verbinden die Hemisegmente entlang der mediolateralen Achse (Campos-Ortega, 1993; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Goodman and Doe, 1993). In bilateralen Organismen ist die korrekte Verknüpfung der beiden Körperhälften von entscheidender Bedeutung. Im zentralen Nervensystem wird diese Verknüpfung über die Kommissuren gewährleistet. Der Großteil aller ZNS-Neurone sind kommissurale Interneurone, die ihr Axon auf die kontralaterale Seite des Nervensystems senden. Alle kommissuralen Neurone müssen während der Entwicklung eine sehr ähnliche Aufgabe lösen. Zunächst müssen ihre Wachstumskegel in Richtung Mittellinie navigieren. Anschließend müssen sie diese kreuzen, um dann auf der kontralateralen Seite weiter zu wachsen. Die Ausbildung der Kommissuren und die damit verbundene Regulation des axonalen Wachstums erfordert attraktive und repulsive Signale. So werden kontralateral projizierende Axone von Signalen der Mittellinie "angezogen", ipsilateral projizierende Axone werden "abgestoßen". Die Bildung der verschiedenen axonalen Trakte erfolgt in einer sequentiellen Abfolge. Zu Beginn des zweiten Drittels der Embryonalentwicklung wird die posteriore Kommissur angelegt. Anschließend wird die anteriore Kommissur in enger räumlicher Nachbarschaft gebildet. Erst durch eine Interkalation von zwei Mittelliniengliazellen werden die beiden Kommissuren in ihre endgültige Sprossenform gebracht (Klämbt and Goodman, 1991).

An der Regulation des axonalen Wachstums im ZNS sind eine Reihe verschiedenster Signale beteiligt, die attraktive oder repulsive Funktionen vermitteln (Dickson, 2002). Für die Kommissurenentwicklung sind zwei prominente Rezeptor-Liganden-Systeme von großer Bedeutung. Eine attraktive Wirkung wird von den NETRINEN und deren Rezeptoren vermittelt (siehe 1.2). Im Zusammenhang mit der Repulsion von Axonen wurde das Rezeptor-Liganden System *robo/slit* beschrieben (siehe 1.3) (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Kidd et al., 1998; Kidd et al., 1998b; Seeger et al., 1993).

Neben diesen beiden attraktiven und repulsiven Mechanismen wurden weitere Signal/Rezeptorsysteme aufgedeckt, die an der Bildung der Kommissuren oder an der Regulation des axonalen Wachstums im ZNS beteiligt sind. Beispielsweise werden Axone, die in die anteriore Kommissur projizieren, durch die Expression der Rezeptor-Tyrosin-kinase *derailed* von Wnt5 Expression (Yoshikawa et al., 2003) in der posterioren Kommissur abgestoßen (Callahan et al., 1995). Des Weiteren kontrolliert das repulsive System SEMAPHORIN-PLEXIN die Innervierung der somatischen Muskulatur durch Motoneurone (Winberg et al., 1998a; Winberg et al., 1998b; Yu et al., 1998). Das ebenfalls repulsive EPHRIN-EPH System sorgt für ein Verbleiben der Interneurone innerhalb des ZNS (Bossing and Brand, 2002). Weitere Gene wurden anhand ihres mutanten Phänotyps identifiziert, eine genauere Analyse der jeweiligen Funktionen steht allerdings noch aus (Hummel et al., 1999).

## 1.2. NETRIN

Formal lösen viele Organismen in der Entwicklung ihres ZNS ähnliche Aufgaben. Ein funktionsfähiges Nervensystem erfordert eine korrekte und oft stereotypische Verschaltung der einzelnen Neurone. Dabei scheinen nicht nur die formalen Aspekte der axonalen Wegfindung, sondern auch die zu grunde liegenden molekularen Mechanismen im Tierreich konserviert zu sein (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

NETRINE sind eine Familie von sekretierten Proteinen, die in Vertebraten und Invertebraten als Signalmoleküle an der axonalen Wegfindung beteiligt sind. Die N-terminalen zwei Drittel der NETRIN-Proteine sind homolog zur  $\gamma$ -Kette des LAMININS, einem heterotrimeren Protein der Extrazellulären Matrix (ECM). Insgesamt besteht NETRIN aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Domäne VI, einer Domäne V

(bestehend aus drei EGF-Strukturmotiven) und einer C-terminalen Domäne C. Das Protein wird in den extrazellulären Raum sezerniert, wo es von den Wachstumskegeln wahrgenommen werden kann. NETRINE sind evolutionär hochkonserviert, und die Proteine dieser Familie üben in allen Organismen in denen sie identifiziert wurden ähnliche Funktionen aus (Harris et al., 1996; Hedgecock et al., 1990; Ishii et al., 1992; Kennedy et al., 1994; Mitchell et al., 1996; Serafini et al., 1994; Strahle et al., 1997).

Das erste charakterisierte NETRIN-Protein, UNC-6 aus *C. elegans*, wurde als Genprodukt identifiziert, das in *unc-6* Mutanten zu Defekten in der Zellmigration und in der axonalen Wegfindung führt (Hedgecock et al., 1990; Hedgecock et al., 1985; Ishii et al., 1992). *unc-6* Expression findet sich in verschiedenen Geweben und Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung. Die verschiedenen UNC-6 Signale sind wesentlich an der Entwicklung des ZNS beteiligt. So spielt UNC-6 sowohl in der axonalen Wegfindung von Pionier- und kommissuralen Axonen als auch bei der korrekten Ausbildung einiger Nervenstränge entlang longitudinaler Bahnen eine Rolle (Lim et al., 1999; Ren et al., 1999).

Nach der Aufreinigung und Charakterisierung zweier Proteine, die das Auswachsen kommissuraler Axone induzieren können, fand man in Vertebraten die NETRINE1 und 2 (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994; Tessier-Lavigne et al., 1988). Sequenzvergleiche zeigten eine hohe Homologie zu dem aus *C. elegans* bereits bekannten UNC-6. Eine Expression der beiden NETRINE findet sich im Rückenmark, sie ist allerdings zwischen NETRIN1 und 2 unterschiedlich. *netrin1* wird in den Zellen der Bodenplatte exprimiert, wohingegen *netrin2*-RNA im ventrolateralen Rückenmark, aber nicht in der Bodenplatte zu finden ist. *In vitro* konnten NETRIN1 und -2 als diffusible Proteine identifiziert werden, die über eine längere Distanz kommissurale Axone des Rückenmarks anziehen konnten. Daraus wurde geschlossen, daß NETRIN von den Bodenplattenzellen des Rückenmarks sezerniert wird und sich über Diffusion ein Proteingradient bildet. Dieser Gradient dient dann den sich entwickelnden kommissuralen Axonen als Information und bewirkt ein Wachstum in Richtung Bodenplatte (Serafini et al., 1996).

### 1.2.1. NETRIN in *Drosophila*

In *Drosophila* wurden zwei NETRINE, NETRINA und NETRINB charakterisiert, die zueinander eine größere Homologie aufzeigen als zu anderen Proteinen der NETRIN-Familie (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996).

#### Netrin A Protein Struktur



Abb. 1 Protein-Struktur von NETRINA

Die erste Expression von *netrinA* und von *netrinB* findet sich im zellulären Blastodermstadium und beschränkt sich auf das präsumptive Mesoderm. Diese Expression ist bis zur Gastrula zu beobachten, nimmt danach allerdings ab. In der weiteren Entwicklung sind *netrinA* und *B* in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben exprimiert; im Dorsalgefäß, in einigen Imaginalscheiben, im Tracheensystem, in einigen dorsalen und ventralen Muskelgruppen, im visceralen Mesoderm und im stomatogastrischen Nervensystem.

Die erste Akkumulation von *netrin*-mRNA im embryonalen ZNS beginnt im Stadium 12. *netrinA*-Expression findet sich in den Mittellinienglia MGA und MGM und in den VUM-Neuronen, sowie in einer großen Gruppe von Zellen, die posterior von der posterioren Kommissur zu finden sind. Bis zum Stadium 14 unterscheidet sich die *netrinB*-Expression nicht von *netrinA*, allerdings findet man in der weiteren Entwicklung eine Expression in einer Gruppe von lateralen Neuronen, die sich nicht mit der *netrinA*-Expression deckt.

Die Deletion von *netrinA* und *B* führt zu einem ZNS Phänotyp, in dem kommissurale Axone verdünnt sind oder gänzlich fehlen. Oftmals sind die Konnektive unterbrochen oder in ihrer Entwicklung gestört. Der kommissurale Phänotyp lässt sich durch ektopische Expression von *netrinA* als auch von *netrinB* im ZNS retten, was auf eine redundante Funktion der beiden Proteine hin deutet. Die Überexpression von NETRIN mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems in wildtypischen Tieren führt ebenfalls zu Defekten in der Entwicklung des ZNS. Diese zeigen sich in der Verdünnung bis hin zum

Verlust einiger Kommissuren. Der Phänotyp prägt sich allerdings nicht so penetrant aus wie in der Verlustmutante.

Dies zeigt die wichtige Funktion von NETRIN bei der Bildung der Kommissuren. Dabei fungiert NETRIN als ein attraktives Signal, welches von den Wachstumskegeln der kommissuralen Axone erkannt wird und diesen ein Kreuzen der Mittellinie ermöglicht.

### 1.2.2. NETRIN-Rezeptoren

Die Funktion von NETRIN als Signal für wandernde Axone wird von Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt. Dabei wurden in verschiedenen Organismen unterschiedliche NETRIN-Rezeptoren entdeckt. In den Untersuchungen, die zuerst eine Funktion von *unc-6* im axonalen Wachstum zeigten, wurden auch die NETRIN-Rezeptoren in *C. elegans*, UNC-40 und UNC-5 identifiziert (Hedgecock et al., 1990). Spätere Ergebnisse zeigten, daß UNC-40 *in vivo* für das ventrale Wachstum von Axonen auf die UNC-6-Quelle verantwortlich ist (Chan et al., 1996). Unc-5 hingegen vermittelt das Unc-6-abhängige dorsale Wachstum als repulsive Antwort auf UNC-6 (Chan et al., 1996; Hamelin et al., 1993; Leonardo et al., 1997).

In Vertebraten wurde ein Homolog von UNC-40, DCC (*deleted in colateral Cancer*), sowie UNC-5 identifiziert. *dcc* wird in der embryonalen Entwicklung auf kommissuralen Axonen exprimiert, und es konnte für DCC eine NETRIN-Bindungs-Aktivität nachgewiesen werden. Die Bedeutung von DCC für das axonale Wachstum wurde zunächst durch *in vitro* Studien aufgedeckt. So wurde gezeigt, daß durch die Blockierung von DCC mit Hilfe eines Antikörpers das NETRIN1 abhängige Auswachsen von kommissuralen und retinalen Axonen unterbleibt (de la Torre et al., 1997; Keino-Masu et al., 1996). Mittlerweile wurde auch *in vivo* in knock-out Mäusen (Deiner et al., 1997; Fazeli et al., 1997) (Deiner and Sretavan, 1999) und in *Xenopus* (Anderson et al., 2000) die Bedeutung von DCC in der neuronalen Entwicklung nachgewiesen.

In Mäusen wurden zudem drei UNC-5 Homologe identifiziert, die NETRIN binden können. Es wird für diese Proteine ähnlich wie in *C. elegans* eine NETRIN-abhängige repulsive Funktion vermutet (Leonardo et al., 1997). Mittlerweile wurden weitere Unc-5 Homologe in *Xenopus* und in der Ratte identifiziert (Anderson and Holt, 2002; Barrett and Guthrie, 2001).

In *Drosophila* wird die attraktive Funktion von NETRIN von FRAZZLED vermittelt. Das Protein besteht aus vier extrazellulären Immunglobulin-C2-Domänen, sechs Fibronectin-III-Domänen sowie einer evolutionär konservierten intrazellulären Domäne (Bashaw and Goodman, 1999; Kolodziej et al., 1996).

Eine *frazzled*-Expression findet sich im Mitteldarm, in der Epidermis und im Nervensystem. Im embryonalen ZNS wird *frazzled* in hohen Konzentrationen auf kommissuralen und longitudinalen Axonen des sich entwickelnden ZNS exprimiert. Auf den peripheren Motoneuronen, die in den intersegmentalen und segmentalen Nerv projizieren, ist die Expression sehr gering. In FRAZZLED-Verlustmutanten kommt es zu Defekten in der frühen Kommissurenentwicklung, in der diese teilweise verdünnt oder abwesend sind. Der Phänotyp deckt sich weitestgehend mit den für NETRIN beschriebenen Defekten des ZNS (Kolodziej et al., 1996).

FRAZZLED zeigt eine hohe Homologie zum NETRIN-Rezeptor DCC in Vertebraten und dem *C. elegans* Homolog UNC-40 (Chan et al., 1996; Keino-Masu et al., 1996). Die attraktive Wirkung der NETRINE wird durch die intrazelluläre Domäne seines Rezeptors FRAZZLED vermittelt. Dies wurde durch die Expression verschiedener chimärer Proteine im ZNS von *Drosophila* nachgewiesen. So wirkt ein chimäres Protein mit der extrazellulären Domäne des FRAZZLED-Proteins und einer intrazellulären Domäne von ROBO als repulsiver Rezeptor für NETRIN. Ein chimäres Protein aus der extrazellulären Domäne von ROBO und der intrazellulären FRAZZLED-Domäne wirkt als attraktiver SLIT-Rezeptor (Bashaw and Goodman, 1999).

Neben FRAZZLED wurde ein weiterer NETRIN-Rezeptor auch in *Drosophila* identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Homolog des aus *C. elegans* bekannten Proteins UNC-5. In *C. elegans* und Vertebraten wurde UNC-5 als Repulsion vermittelnder NETRIN-Rezeptor beschrieben. Auch in *Drosophila* deuten die Expression von UNC-5 und Daten aus Überexpressionsexperimenten darauf hin, dass UNC-5 hier eine repulsive Funktion vermittelt (Keleman and Dickson, 2001).

### **1.2.3. Die Funktion des NETRIN-Signals**

Verschiedene Studien geben Einblick in die genauere Funktion der NETRINE und ihrer Rezeptoren sowie ihrer Bedeutung außerhalb der axonalen Wegfindung. Neben der rezeptorvermittelten Repulsion über UNC-5 ist eine repulsive Wirkung der NETRINE in Abhängigkeit anderer Faktoren wie der cAMP-Konzentration und LAMININ

beschrieben worden. Wachstumskegel von isolierten Neuronen aus dem Rückenmark von *Xenopus* wachsen *in vitro* auf eine NETRIN-Quelle zu. Verändert man die cAMP-Konzentration innerhalb des Wachstumskegel, z.B. durch Inhibition der Proteinkinase A (PKA), antwortet dieser mit einer Änderung seiner Wachstumsrichtung (Ming et al., 1997). Das attraktive Signal einer NETRIN-Quelle wird so durch das Herabsetzen der PKA-Aktivität in ein repulsives umgewandelt. In dem selben Versuchsaufbau konnte außerdem eine Abhängigkeit des NETRIN-Signals von LAMININ gezeigt werden (Höpker et al., 1999). Eine Erhöhung der LAMININ-Konzentration im Medium bewirkt *in vitro* eine Änderung der NETRIN-Signalwirkung von Attraktion in Repulsion. Somit wurde erstmals eine Interaktion zwischen NETRIN und der extrazellulären Matrix nachgewiesen.

Außer den Rezeptoren die die attraktive oder repulsive Funktion der NETRINE vermitteln, wurden weitere Komponenten identifiziert die an der rezeptorvermittelten Funktion der NETRINE beteiligt sind. So wurde in *C. elegans* gezeigt, daß CED-10 (eine Rac GTPase), UNC-34 (ein Enabled Homolog) und UNC-115 (ein putatives Aktin bindendes Protein) eine Funktion im UNC-40 Signalweg haben (Gitai et al., 2003).

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass die Reaktion eines Wachstumskegels auf eine NETRIN-Quelle durch Blockierung der Translation unterbleibt. Außerdem aktiviert NETRIN in einzelnen Neuronen Translations-Initiations-Faktoren und stimuliert innerhalb von Minuten die Proteinsynthese (Campbell and Holt, 2001). Dieses Ergebnis wird ergänzt durch die Tatsache das Dcc den MAP-Kinase Signalweg aktiviert (Forcet et al., 2002).

Erste Ergebnisse deuten außerdem auf eine neue Funktion der NETRINE hin. In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass NETRIN1 in Abhängigkeit seiner Rezeptoren Dcc und UNC-5 als eine Art "Überlebens-Faktor" für Neurone fungiert (Llambi et al., 2001; Mehlen and Mazelin, 2003).

Für die axonale Wegfindung kommissuraler Axone ist es von Bedeutung, dass nach dem Passieren des NETRIN-Signals die Wachstumskegel von der Quelle abgestoßen werden. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass dieser Wechsel von Attraktion zu Repulsion in Abhängigkeit zur Aktivierung des SLIT-Rezeptors ROBO steht. Für dieses "Silencing" des NETRIN-Signals ist vermutlich die direkte Bindung von Dcc und ROBO verantwortlich (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Eine weitere direkte Verbindung zwischen UNC-40/Dcc und dem SLIT-Rezeptor ROBO findet sich in *C. elegans*. Dort konnte für UNC 40 eine SAX3 (das ROBO Homolog in *C. elegans*) abhängige repulsive Funktion nachgewiesen werden (Yu et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass die

Rezeptor-Liganden Systeme Netrin/Dcc und Slit/Robo nicht strikt voneinander zu trennen sind. Ausserdem weisen sie darauf hin, dass trotz der relativ geringen Anzahl von bekannten Wegfindungsfaktoren eine grosse Variabilität in der Kombination für unterschiedlichste Informationen sorgt. So kann die hohe Komplexität des ZNS auch durch wenige Faktoren in seiner Entwicklung gesteuert werden.

### 1.3. SLIT

Die SLIT-Proteine gehören zu einer hoch konservierten Familie von sekretierten Proteinen, die eine bedeutende Rolle in der axonalen Wegfindung spielen. SLIT wurde als erstes in *Drosophila* entdeckt (Rothberg et al., 1988). Der Verlust von *slit* führt im *Drosophila* Embryo zum kompletten Kollaps aller ZNS-Axone an der Mittellinie. In weiteren Analysen stellte sich heraus, daß SLIT eine Bedeutung in der axonalen Wegfindung hat (Rothberg et al., 1990). Erst nach Identifizierung von *roundabout* (*Robo*) (Kidd et al., 1998; Seeger et al., 1993) und dem späteren Nachweis der Bindung von ROBO und SLIT (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999) wurde SLIT als Ligand von ROBO identifiziert und eine Funktion als repulsives Signal in der axonalen Wegfindung nachgewiesen.

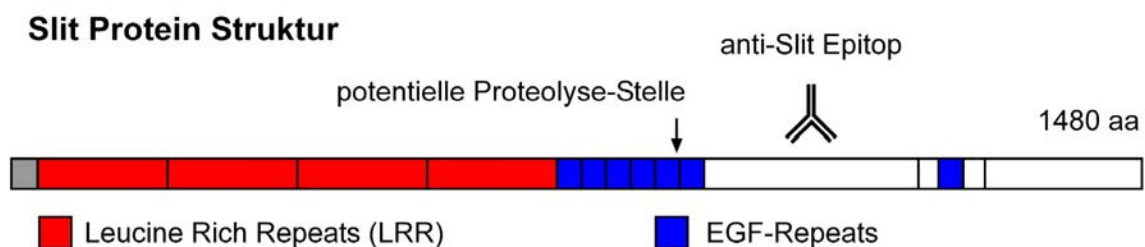


Abb.2 Protein-Struktur von *Drosophila*-SLIT

Die SLIT-Proteine bestehen aus einer putativen Signalsequenz, vier aufeinander folgenden LRR-Repeats, einer Reihe EGF-Repeats, einer Laminin-G-Domäne sowie einem Cystein"-Knot" der in verschiedenen sekretierten Wachstumsfaktoren identifiziert wurde. Die Proteine der SLIT-Familie sind evolutionär hochkonserviert und üben in allen Organismen in denen sie identifiziert wurden eine ähnliche Funktion



aus (Brose et al., 1999; Hao et al., 2001; Holmes and Niswander, 2001; Kidd et al., 1999; Li et al., 1999; Yeo et al., 2001).

Genau wie die NETRINE und dessen Rezeptoren ist auch das Rezeptor-Liganden-System SLIT/ROBO im Tierreich hoch konserviert. Die Proteine der SLIT- und ROBO-Familie wurden sowohl in unterschiedlichen Vertebraten-Spezies als auch in *C. elegans* charakterisiert. In Vertebraten wurden drei SLIT-Proteine (Holmes et al., 1998; Itoh et al., 1998; Wang et al., 1999; Yuan et al., 1999), sowie drei Proteine der ROBO Familie identifiziert (Brose et al., 1999; Fricke et al., 2001; Li et al., 1999; Yuan et al., 1999). *In vitro* konnte für SLIT1 und SLIT2 eine repulsive Funktion nachgewiesen werden. SLIT1 und SLIT2 reprimieren das Auswachsen olfaktorischer Neurone (Li et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Yuan et al., 1999), während SLIT2 alleine in der Repulsion von Motoraxonen des Rückenmarks (Brose et al., 1999), von hippocampalen Axonen (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999) sowie retinaler Axone (Erskine et al., 2000; Niclou et al., 2000; Ringstedt et al., 2000) beschrieben wurde. Zusätzlich reprimieren SLIT1 und SLIT2 *in vitro* die Migration neuronaler Vorläuferzellen (Hu, 1999; Wu et al., 1999; Zhu et al., 1999) und aufgereinigtes SLIT2 stimuliert Axon-Verlängerung und -Verzweigung (Wang et al., 1999). Durch das Ausschalten aller *slit* und *robo* Allele in Vertebraten konnte zudem die Bedeutung der Proteine im ZNS nachgewiesen werden. So haben SLIT und ROBO auch in Vertebraten eine Schlüsselrolle im axonalen Wachstum kommissuraler Axone an der Mittellinie (Long et al., 2004).

In *C. elegans* wurde ein Protein der SLIT-Familie (SLT1) sowie ein ROBO-Homolog (SAX3) charakterisiert (Hao et al., 2001; Zallen et al., 1998a). Auch hier zeigt sich eine eindeutige Funktion von SLIT und ROBO im Zusammenhang mit der axonalen Wegfindung von ventralen und kommissuralen Axonen (Zallen et al., 1998b). Für SAX-3 konnte zudem neben der SLIT-abhängigen Funktion eine SLIT-unabhängige Funktion in der Entwicklung nachgewiesen werden (Hao et al., 2001).

SLIT wurde zunächst als Signal der axonalen Wegfindung charakterisiert. Neben dieser Funktion spielt SLIT eine bedeutende Rolle bei einer Reihe weiterer nicht neuronaler Zellmigrationsprozesse (Piper and Little, 2003). In *Drosophila* ist SLIT unter Anderem an der Mesoderm-, Muskel- und Tracheenentwicklung beteiligt (Englund et al., 2002; Kidd et al., 1999; Kramer et al., 2001; Schimmelpfeng et al., 2001). Neben der neuronalen Funktion der SLIT-Proteine wurden auch in Vertebraten weitere Funktionen in anderen Prozessen nachgewiesen. Beispielsweise dient SLIT im Zebrafisch während der Gastrulation als Regulator der mesodermalen

Zellmigration (Yeo et al., 2001). Zudem wird SLIT während der Embryonalentwicklung in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert. So findet sich eine SLIT-Expression auch im Auge, im Herz, in den Extremitäten, in den Somiten sowie im Urogenital-System (Holmes and Niswander, 2001; Holmes et al., 1998; Piper et al., 2000; Vargesson et al., 2001).

### 1.3.1. SLIT in *Drosophila*

In *Drosophila* wurde ein Protein der SLIT-Familie identifiziert und in der Funktion und Expression eingehend beschrieben (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990). Die erste SLIT-Expression im zellulären Blastoderm findet sich im Ektoderm. Erst nach der Gastrulation während der Keimstreif-verlängerung findet sich eine Expression in den Zellen des Mesektoderms. Nach dem Keimstreifrückzug und der Kondensation des ZNS beschränkt sich die SLIT Expression auf die Mittelliniengliazellen. Während dem dorsalen Schluss findet sich eine weitere schwache Expression in den Cardioblasten, den Vorläuferzellen des Dorsalgefäßes. Eine weitere Expression findet sich in den Muscle-Attachement-Sites (Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990). Die ersten Expressionsstudien zeigten zudem eine schwache Expression von SLIT auf kommissuralen und longitudinalen Axonen (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1990).

Der Ausfall von *slit* führt im *Drosophila* Embryo zum kompletten Kollaps der Axone an der ZNS-Mittellinie. Anstatt des regelmässigen ZNS-Musters findet man ein durchgehendes Axonbündel in der Mittellinie. Die ipsilateral und kontralateral projizierenden Neurone wachsen auf die Mittellinie zu, können diese aber nicht verlassen (Jacobs, 2000; Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988). Dies zeigt die Bedeutung des SLIT-Proteins als repulsives Signal für kommissurale Axone.

Die Struktur von SLIT weist darauf hin, dass es sich bei SLIT um ein sezerniertes Protein handelt. Die Expression in einer *Drosophila*-Zelllinie (Schneiderzellen) und die anschließende Aufreinigung des Überstandes zeigte experimentell die Sezernierung von SLIT (Rothberg et al., 1990). Dies wurde später durch Ergebnisse in Vertebraten untermauert (Brose et al., 1999).

Die SLIT-Proteine werden proteolytisch gespalten. Western-Blot-Analysen haben gezeigt, dass SLIT-Proteine proteolytisch in ein ca. 140kDa großes N-terminales Fragment und ein ca. 55-60kDa großes C-terminales Fragment gespalten werden

(Brose et al., 1999). Zellkultur-Experimente in Vertebraten zeigen zudem verschiedene wachstums-fördernde Eigenschaften der unterschiedlichen Fragmente (Nguyen Ba-Charvet et al., 2001). Auch *Drosophila*-SLIT wird in zwei Fragmente gespalten, die *in vivo* nachweisbar sind. Genetische Analysen deuten darauf hin, daß SLIT in *Drosophila* von KUZBANIAN, einer Protease der ADAM-Familie, gespalten wird (Schimmelpfeng et al., 2001).

Neben der Funktion in der axonalen Wegfindung ist SLIT in *Drosophila* an weiteren Prozessen der Embryogenese beteiligt. So zeigt sich SLIT in der Muskelentwicklung verantwortlich für das Wachstum von Muskelvorläuferzellen weg von der Mittellinie. In *slit*-mutanten Embryonen wächst die laterale Muskulatur im Gegensatz zur wildtypischen Situation über das ZNS (Jacobs, 2000; Kidd et al., 1999). In der Migration mesodermaler Zellen hat SLIT neben einer repulsiven Funktion zudem eine attraktive Wirkung auf ROBO-exprimierende Zellen (Kramer et al., 2001). Auch in der Entwicklung der embryonalen Kopfentwicklung scheint SLIT eine attraktive Funktion zu haben (Schimmelpfeng et al., 2001). Desweiteren ist eine Funktion von SLIT in der Tracheenentwicklung beschrieben. Auch hier wirkt SLIT als repulsives oder attraktives Signal auf unterschiedliche Tracheenäste (Englund et al., 2002).

### 1.3.2. SLIT-Rezeptoren

Ähnlich den NETRINEN wird auch die repulsive Funktion von SLIT von seinen Rezeptoren vermittelt. Dabei stellen die Proteine der Robo-FAMILIE die Rezeptoren für ihren Liganden SLIT dar (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999). Als erstes wurde *roundabout* (*robo*; *robo1*) identifiziert (Seeger et al., 1993). *roundabout* kodiert einen Transmembranrezeptor, bestehend aus fünf Immunglobulin (Ig)-Domänen, drei Fibronectin-Typ-III-Domänen, einer Transmembran-Domäne und einer großen cytoplasmatischen Domäne (Kidd et al., 1998). Das Protein wird in lateralen Neuronen exprimiert und findet sich in hoher Konzentration auf ipsilateral projizierenden Axonen (Kidd et al., 1999). *roundabout*-mutante Embryonen zeigen einen charakteristischen ZNS Phänotyp, bei dem das kommissurale Wachstum dahingehend gestört ist, daß zu viele Axone die Mittellinie kreuzen (Kidd et al., 1998; Seeger et al., 1993). Neben *roundabout* wurden zwei weitere Proteine der ROBO-Familie in *Drosophila* identifiziert, ROBO2 und ROBO3. Die genaue Analyse der Expression der verschiedenen ROBO's sowie ihrer Ausfall-Phänotypen zeigt deren

Bedeutung in der Musterbildung der longitudinalen Axontrakte im ZNS (Rajagopalan et al., 2000; Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000; Simpson et al., 2000b). Dabei werden die ROBO's in unterschiedlichem Ausmaß auf den longitudinalen Axontrakten des ZNS exprimiert. ROBO1 findet sich auf allen Axontrakten, ROBO3 auf intermedialen sowie lateralen und ROBO2 findet sich ausschließlich auf lateralen Axontrakten. Über die unterschiedliche Expression der ROBO's werden die kontralateral projizierenden Axone in ihre jeweiligen longitudinalen Axontrakte sortiert. Diese Ergebnisse zeigen zudem *in vivo*, daß SLIT neben der "short-range" Funktion für kommissurale Axone auch eine "long-range" Funktion für longitudinale Axone vermittelt. Dies erfordert die Sezernierung des SLIT-Signals und weist auf eine graduelle Verteilung des SLIT-Proteins im ZNS hin.

Für ROBO1 konnte zudem nachgewiesen werden, wie das Protein in seiner Expression durch COMMISSURELESS (COMM) reguliert wird. So konnte gezeigt werden, daß COMM die intrazelluläre Verteilung von ROBO1 reguliert. Dabei fungiert COMM als eine Art Rezeptor der seine Liganden für die intrazelluläre Degradation sortiert (Keleman et al., 2002).

#### **1.4. Die Extrazelluläre Matrix (ECM)**

In der Regulation der axonalen Wegfindung spielen sezernierte Signalmoleküle eine bedeutende Rolle. In *Drosophila* und Vertebraten wurde für NETRIN und SLIT eine "long range" Funktion gezeigt. Sie werden von den exprimierenden Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert und wirken über eine größere Distanz auf wandernde Axone. In verschiedenen Organismen wurde vermutet, dass die sezernierten Signale durch die Extrazelluläre Matrix (ECM) reguliert werden können. Die Extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein wichtiger Bestandteil der basalen zellulären Umgebung. Sie setzt sich aus großen Glykoproteinen, Proteoglycanen und Glykosaminoglycanen zusammen. Die ECM bildet ein organisiertes Netzwerk, welches an vielen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist (Adams and Watt, 1993; Gullberg and Ekblom, 1995; Pires Neto et al., 1999). Viele der bekannten ECM-Proteine sind evolutionär hoch konserviert. Man findet sie in Vertebraten und in Invertebraten. Die Bedeutung der ECM während der Entwicklung wurde durch die Charakterisierung von Mutationen, die die ECM und deren Rezeptoren betreffen, in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen. So sind in *C.*

*elegans* über 50 Mutationen bekannt, die zu einem Großteil die Morphologie des Organismus beeinträchtigen und deren betroffene Gene für Proteine der ECM kodieren. Der überwiegende Teil an ECM-Mutationen in Vertebraten wurde im Menschen identifiziert, wo eine Vielzahl von Erbkrankheiten auf Defekte in der ECM zurückzuführen sind (Adams and Watt, 1993).

Die am besten verstandene zelluläre Interaktion mit der ECM ist die Zelladhäsion. Sie wird durch die Bindung spezifischer Zelloberflächen-Proteine an bestimmte zellbindende Domänen der ECM-Komponenten vermittelt. Diese Adhäsion ist für viele zelluläre Migrationsprozesse von großer Bedeutung, wie zum Beispiel bei der Wanderung von Neuralleistenzellen oder Keimzellen (Adams and Watt, 1993; Letourneau et al., 1994). Auch bei der Wanderung neuronaler Zellen und ihrer Vorläufer sowie beim Auswachsen von Axonen und Dendriten spielt die ECM eine entscheidende Rolle. So findet man in der embryonalen Entwicklung eine Vielzahl verschiedener ECM-Komponenten im neuronalen Gewebe. Dazu zählen Proteine der LAMININ-, TENASCIN-, COLLAGEN- und THROMBOSPONDIN-Familien, sowie FIBRONECTIN, VITRONECTIN und einige Proteoglycane. Für alle diese Proteine konnte außerdem *in vitro* gezeigt werden, daß sie Neuritenwachstum modulieren können (Letourneau et al., 1994; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Desweiteren konnte eine Interaktion von SLIT mit den Heperan-Sulfat-Preteoglycanen, GLYPICAN und SYNDECAN nachgewiesen werden (Johnson et al., 2004; Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001). Die Funktionen der ECM werden oftmals durch entsprechende Rezeptoren vermittelt. Man unterscheidet zwei Klassen von Rezeptoren. Die Integrin- und die Nicht-Integrin-Rezeptoren. Während man in der Klasse der Nicht-Integrine diverse Moleküle wie Zelloberflächen-Proteoglycane oder einige LAMININ-bindende Proteine zusammenfaßt, stellen die Integrine eine große Gruppe von  $\alpha/\beta$ -heterodimeren Transmembranproteinen dar. Verschiedene  $\alpha/\beta$ -Kombinationen haben eine eigene Bindungsspezifität, wobei die meisten Integrine mehrere unterschiedliche ECM-Proteine binden (Bokel and Brown, 2002; Tarone et al., 2000). Die zeitliche und gewebespezifische Expression von Integrinen in der neuronalen Entwicklung verschiedener Organismen weist auf eine mögliche Bedeutung in der Neurogenese hin (Letourneau et al., 1994). Für Integrine wurde außerdem in verschiedenen zellulären Prozessen der Wirkmechanismus über diverse Signaltransduktionswege aufgedeckt (Giancotti and Ruoslahti, 1999).

### 1.4.1. ECM in *Drosophila*

In *Drosophila* wurde eine Vielzahl von ECM-Proteinen identifiziert, die hauptsächlich von Makrophagen/Haemozyten und glialen Zellen sezerniert werden (Fessler et al., 1994). Eine Reihe von Proteinen wurde charakterisiert und teilweise in ihrer Funktion für die embryonale Entwicklung beschrieben. Man fand drei verschiedene LAMININ-Untereinheiten, die an unterschiedlichen morphogenetischen Prozessen beteiligt sind wie beispielsweise der Darm- und Herz-Entwicklung (Garcia-Alonso et al., 1996; Garrison et al., 1991; Henchcliffe et al., 1993; Martin et al., 1999; Montell and Goodman, 1989; Yarnitzky and Volk, 1995). Bekannt sind TIGGRIN, ein neuartiges sezerniertes Protein, daß von Integrinen gebunden wird, M-SPONDIN, ein *Drosophila*-Homolog zum Vertebraten-F-SPONDIN, und Proteine der TENASCIN-FAMILIE (Baumgartner and Chiquet-Ehrismann, 1993; Baumgartner et al., 1994; Fogerty et al., 1994; Umemiya et al., 1997). PAPILIN, SYNDECAN und DALLY sind Beispiele für Proteoglycane in *Drosophila* (Campbell et al., 1987; Nakato et al., 1995; Spring et al., 1994). Es wurden eine Reihe von Sequenzen mit Ähnlichkeit zu COLLAGEN IV identifiziert (Le Parco et al., 1986). Die Analyse der Genom-Sequenz von *Drosophila* ergab allerdings, daß es nur drei verschiedene COLLAGENE in *Drosophila* gibt (Rubin et al., 2000). Die Funktion von COLLAGEN IV während der Muskel-Entwicklung wurde bereits untersucht (Borchiellini et al., 1996). Interessanterweise befinden sich im *Drosophila*-Genom zwei COLLAGEN Typ IV Gene in unmittelbarer Nachbarschaft (Yasothornsrikul et al., 1997).

Verschiedene Untersuchungen zeigen den Beitrag der ECM in der neuronalen Musterbildung von *Drosophila*. Zum einen wird für SYNDECAN und DALLY-LIKE eine Funktion in der Regulation des SLIT-Signals vermutet (Johnson et al., 2004). Zum anderen deutet beispielweise die Expression von Collagen TypIV auf eine Beteiligung von COLLAGEN an der axonalen Musterbildung hin. COLLAGEN kann bereits sehr früh im ZNS auf den sich entwickelnden Axonbahnen nachweisen werden (Mirre et al., 1992).

Neben den Proteinen der ECM wurden auch einige Integrine in *Drosophila* charakterisiert. Für diese Rezeptoren der ECM wird ebenfalls eine Bedeutung in der axonalen Wegfindung vermutet (Brabant and Brower, 1993; Brown, 1993; Bunch and Brower, 1992; Gotwals et al., 1994; Hoang and Chiba, 1998; Stevens and Jacobs, 2002).

### **1.5. Ziel der Arbeit**

In der axonalen Wegfindung spielen sezernierte Signalmoleküle eine bedeutende Rolle. Für viele Prozesse dieser axonalen Wegfindung ist eine Sezernierung der Signale erforderlich. In dieser Arbeit sollten die sezernierten Proteine NETRIN und SLIT in ihrer Funktion und insbesondere in ihrer Verteilung genauer betrachtet werden. Dafür wurden verschiedene modifizierte NETRIN- und SLIT-Konstrukte generiert und *in vitro* und *in vivo* exprimiert.

Zudem wurde die Bedeutung der Extrazellulären Matrix (ECM) in der Entwicklung des embryonalen ZNS von *Drosophila* analysiert. Die ECM hat vermutlich einen Einfluß auf die Verteilung sezernierter Signalmoleküle, was im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den folgenden Firmen in der Qualität *pro-analysis* bezogen.

Aldrich (Steinheim)	Baker (Groß-Gerau)	Biomol (Hamburg)
Biozym (Hameln)	Fluka (Neu Ulm)	La Roche (Mannheim)
GIBCO/BRL (Eggenstein)	Merck (Darmstadt)	Pharmacia/LKB (Freiburg)
Roth (Karlsruhe)	Serva (Heidelberg)	Sigma (Deisenhofen)

Lösungen für molekularbiologische Arbeiten und Zellkulturarbeiten wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert.

#### 2.1.2. Puffer, Medien und Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18 g Agar/500 ml H <sub>2</sub> O autoklavieren, 150 ml H <sub>2</sub> O zugeben, aufkochen, 3 ml Eisessig zugeben.
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie R250 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	30% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Methanol
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) DEPC in H <sub>2</sub> O ü. N. lösen und autoklavieren.



## Material und Methoden

<i>Drosophila</i> Standardmedium (pro Liter Leitungswasser)	8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt 41 g Rübensirup hinzugeben, auf 60 °C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Eßlöffel Nipagin hinzugeben.
Ethidiumbromid	10 mg/ml (Stocklösung) davon 4 µl/100ml Agarosegel
Gelladepuffer (10 x)	4 M Harnstoff 50 % Saccharose 50 mM EDTA Spatelspitze Xylencyanol Spatelspitze Bromphenolblau
Heptan-Fixans Glutaraldehyd (Antikörperfärbung)	4 % Glutaraldehyd in PBS 1:1 mit Heptan auffüllen, schütteln, nach Phasentrennung die gesättigte Heptanphase zur Fixierung verwenden. (kann wiederverwendet werden)
Heptan-Fixans Formaldehyd	5% Formaldehyd in PBS 1:1 mit Heptan auffüllen, schütteln, nach Phasentrennung die gesättigte Heptanphase zur Fixierung verwenden.
Heptankleber	Zerkleinertes Klebeband (Tesapack; Beiersdorff, Hamburg) wird in einer Weithalsflasche (500 ml) mit 150 ml Heptan überschichtet. Durch Schütteln (ca. 5 h) den Kleber in Heptan lösen. Den Überstand für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand als Kleber verwenden.

## Material und Methoden

Hitzefixierungs-Lösung	3ml Triton 40g NaCl ad 1l H <sub>2</sub> O
Hybridisierlösung ( <i>in situ</i> )	Hinzugabe von 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA zum Hybridisierungspuffer.
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween 20
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA, 1,5 µg Helper-DNA (Laski et al., 1986), 1 µl Lebensmittelfarbe, 1,5 µl 10 x Injektionspuffer ad 15 µl H <sub>2</sub> O
Injektionspuffer (10 x)	1 mM PO <sub>4</sub> -Puffer (pH 7,4), 50 mM KCl
IPTG	zur blau-weiß Selektion 100 mM IPTG in ddH <sub>2</sub> O bei -20°C lagern
LB-Medium	10 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Yeast Extract, 10 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O (auf pH 7 einstellen) und autoklavieren.
LB-Agarplatten	24 g Agar/l Medium
Lysispuffer (genom. DNA)	0,1 M Tris pH 9 0,1 M EDTA 1 % Natriumlaurylsulfat (SDS)

## Material und Methoden

Lysispuffer (Proteinextrakte )	1% NP40 in ddH <sub>2</sub> O 1 mM DTT 1 mM PMSF
Mowiol	12 g Mowiol in 30 g Glycerin (fluoreszenzfrei) 2 h unter intensivem Rühren lösen. Dabei leicht erwärmen. 30 ml ddH <sub>2</sub> O zugeben und 5 min rühren. 60 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugeben. 10 min bei 56°C leicht rühren. 15 min bei 5000 g zentrifugieren. Den klaren Überstand portionieren und bei -20°C aufbewahren
Natriumhypochloritlösung	10-15 % aktives Chlor (Chlorbleichlauge Schindler & Co.) 1:1 mit H <sub>2</sub> O verdünnen.
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl (pH 7,6)
PBT	0,1 % Triton X-100 in PBS
Phosphatpuffer, 1 M, pH 7,2	68,4 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 31,6 ml 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer, 1 M, pH 7,4	77,4 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 22,6 ml 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## Material und Methoden

Ponceau S Färbelösung	3 % Essigsäure 0,3 % Ponceau S
QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100
QC	1 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
QF	1,25 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 8,5 15% Isopropanol
RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem H <sub>2</sub> O
SDS (10 %)	10% Natriumdodecylsulfat in ddH <sub>2</sub> O SM-Puffer 10 mM NaCl 10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM 1 M Tris/HCl, pH 7,5
SDS-Page	
2 x SDS-Probenpuffer	0,125 M Tris-Cl 4 % SDS 20 % Glycerol 0,02 % Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol, auf pH 6,8 einstellen.
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

## Material und Methoden

4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgel 4 % (10ml)	1,33 ml Acrylamid-Lösung 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer 0,1 ml 10 % SDS 6 ml H <sub>2</sub> O 100 µl 10 % APS 10 µl TEMED
Trenngel 7,5 % (30 ml)	7,5 ml Acrylamid-Lösung 7,5 ml 4 x Trenngelpuffer 0,3 ml 10 % SDS 14,6 ml H <sub>2</sub> O 200 µl 10 % APS 15 µl TEMED
Elektrodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS, auf pH 8,3 einstellen.
SB Medium	35 g Trypton 20 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1l H <sub>2</sub> O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
SOC Medium	2 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> autoklavieren, dann auf 20 mM Glucose einstellen.

## Material und Methoden

SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
STET-Puffer	8 % Saccharose 5 % Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
TBE	50 mM Tris/HCl, pH 8,2 50 mM Borsäure 5 mM EDTA
TBS/Tween 20	20 mM Tris/HCl, pH7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,2 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 129 mM Glycin 10% MetOH pH 8,2 - 8,4
Tris/HCl	1 M Trisbase mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen.
X-Gal (40%)	zur blau - weiß Selektion 400 mg X-Gal in 10 ml DMF lösen Bei - 20°C lagern

## 2.2. Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Herkunft
pBlueskript SK+	Standardklonierungen	Stratagene, Heidelberg
pGEM T-Easy	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Mannheim
pUAST	P-Element Transformationsvektor	(Brand and Perrimon, 1993)
pWIZ	Generierung von RNAi Konstrukten	(Lee and Carthew, 2003)
pKK 31	8 fach Myc-Vektor	B.Dickson unveröffentlicht
pP{Ac <sup>Bam</sup> }	Klonierungsvektor für Zellkulturtransfektionen mit dem Actin 5C Promotor	Kraznow, 1989

### 2.2.1. Verwendete cDNAs

<i>slit</i> (LD 39407)	BDGP
<i>slit</i> (gH09454)	BDGP
<i>slit</i> (pcDNA3-slit)	B. Dickson unveröffentlicht
<i>Netrin A</i>	(Mitchell et al., 1996)
<i>Netrin B</i>	(Mitchell et al., 1996)

### 2.2.2. Verwendete Oligonukleotide

Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide findet sich im Anhang

### 2.2.3. Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
DH5 $\alpha$	GIBCO/BRL, Eggenstein
XL1 blue	GIBCO/BRL, Eggenstein

## 2.2.4. Antikörper

### 2.2.4.1. Primäre Antikörper

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Referenz/Herkunft
1D4 (anti fasII)	Maus	1:5	Helt & Goodman, unveröffentlicht
BP102	Maus	1:50	Patel & Goodman, unveröffentlicht
22C10 (anti-FUTSCH)	Maus	1:50	(Fujita et al., 1982)
anti-β-Galaktosidase	Kaninchen	1: 5000	Cappel
anti-HRP-FITC (-Cy3; -Cy5)	Ziege	1:100	Dianova
anti-SLIT (C555.6D)	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-MYC (9E10)	Maus	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-MYC (c-myc)	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
anti-FLAG M2	Maus	1:5000	Sigma
anti-FLAG M5	Maus	1:1000	Sigma
anti-α-SPECTRIN (3A9)	Maus	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-DISCS-LARGE (4F3E3)	Maus	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Drab4	Rabbit	1:500	Gonzales-Gaitan, unveröffentlicht
anti-Drab5	Rabbit	1:1000	Gonzales-Gaitan, unveröffentlicht
anti-Drab7	Rabbit	1:1000	Gonzales-Gaitan, unveröffentlicht
anti-Drab11	Rabbit	1:1000	Gonzales-Gaitan, unveröffentlicht

### 2.2.4.2. Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Herkunft
Ziege anti-Maus	HRP	1:500	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	alkalische Phosphatase	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	HRP	1:500	Dianova GmbH



Ziege anti-Kaninchen	alkalische Phosphatase	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Ratte	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
anti-Digoxigenin	alkalische Phosphatase	1:2000	Roche

## 2.2.5. Verwendete Fliegenstämme

### 2.2.5.1. Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>OregonR</i>	Wildtyp	(Lindsley and Zimm, 1992)
$w^{1118}$	$w^{\bar{}}$	(Lindsley and Zimm, 1992)
$w^{\bar{}}; \pi\Delta 2-3, Ki, p^{\bar{}} / TM3$	Transposase 3. Chromosom	(Robertson et al., 1988)
$Cyo^{bb} [w^+, elav-lacZ]$	Balancer 2. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
$Cyo^{bb} [ry^+, ftz-lacZ]$	Balancer 2. Chromosom	Hiromi, unveröffentlicht
$w^{\bar{}}; In[2LR]Gla, wg / Cyo, P[w^+; [Gal4-twi]2.2], P[UAS-2xEGFP]$	GFP-Balancer 2. Chromosom	Bloomington
<i>TM2, Ubx</i>	Balancer 3. Chromosom	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>MKRS, Sb</i>	Balancer 3. Chromosom	(Lindsley and Zimm, 1992)
$TM3^{bb}, Sb P[ry^+, ftz-lacZ]$	Balancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht

TM6 <sup>bb</sup> , Tb P[w <sup>+</sup> , Ubx-lacZ]	Balancer 3. Chromosom	Vässin, unveröffentlicht
w <sup>-</sup> ; ; TM3, Sb/TM6B, Hu Tb	Doppelbalancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
w <sup>-</sup> ; CyO/Sp; MKRS/TM2	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
FM7c <sup>bb</sup> P[ry <sup>+</sup> , ftz-lacZ]	Balancer X Chromosom	Hiromi, unveröffentlicht
w <sup>-</sup> ; CyO <sup>bb</sup> P[ry <sup>+</sup> , elav-lacZ]/Sp; TM2/TM6B <sup>bb</sup> P[w <sup>+</sup> , Ubx-lacZ]	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
brk <sup>F124</sup> /FM7c <sup>bb</sup> P[ry <sup>+</sup> , ftz-lacZ]; CyO <sup>bb</sup> P[ry <sup>+</sup> , ftz-lacZ]/Tft	Doppelbalancer X/2. Chromosom	Lammel, unveröffentlicht
brk <sup>F124</sup> /FM7c <sup>bb</sup> P[ry <sup>+</sup> , ftz-lacZ]; TM3 <sup>bb</sup> , Sb P[ry <sup>+</sup> , ftz-lacZ]/Scr	Doppelbalancer X/3. Chromosom	Lammel, unveröffentlicht

### 2.2.5.2. Verwendete Deletions- und Einzelmutationen

Eine genaue Auflistung der Einzel- und Deletionsmutationen in bezug auf betroffenes Genprodukt, Letalität und cytologische Kartierung findet sich im Anhang.

#### 2.2.5.2.1. X-chromosomale Mutanten

Stammnummer	Einzelmutation	Allel	Referenz
59	<i>mysospheroid (mys)</i>	1	(Digan et al., 1986)
1483	<i>multiple edematous wings (mew)</i>	M6	(Roote and Zusman, 1995)
2176	<i>inflated (if)</i>	B2	(Brabant and Brower, 1993)
4284	<i>terribly reduced optic lobes (trol)</i>	13	(Shannon et al., 1972)

Deletionsmutationen	Bruchpunkte	Referenz
<i>Df(1)RK2</i>	12 D2-E1;13 A2-A5	(Drysdale et al., 1991)
<i>Df(1) KA 9</i>	12 E2- F7;13 A2-A5	(Livingstone, 1985)

### 2.2.5.2.2. Zweitchromosomale Mutanten

Stammnummer	Einzelmutationen	Allel	Referenz
499	<i>Collagen Typ IV (Cg25C)</i>	<i>A109.1F2</i>	(Rodriguez et al., 1996)
DCg 234-	<i>Collagen Typ IV (Cg25C)</i>	<i>234-9</i>	(Gellon et al., 1997)
DCg 412	<i>Collagen Typ IV (Cg25C)</i>	<i>412</i>	(Gellon et al., 1997)
-	<i>M-Spondin(mspo)</i>	<i>C 26</i>	(Umemiya et al., 1997)
3098	<i>scab (scb)</i>	<i>2</i>	(Stark et al., 1997)
-	<i>Slit (sli)</i>	<i>Slit<sup>550</sup></i>	(Battye et al., 2001)
-	<i>Slit (sli)</i>	<i>Slit<sup>B1-32</sup></i>	(Schimmelpfeng et al., 2001)
BL-12377	<i>syndecan (sdc)</i>	<i>l(2)10608</i>	(Spradling et al., 1999)
BL-10431	<i>syndecan (sdc)</i>	<i>l(2)k10215</i>	(Spradling et al., 1999)
-	<i>Tiggrin (tig)</i>	<i>x</i>	(Bunch et al., 1998)
P404	<i>viking (vkg)</i>	<i>k07138</i>	(Rodriguez et al., 1996)
P473	<i>viking (vkg)</i>	<i>K00236</i>	(Spradling et al., 1999)
vkg 228	<i>viking (vkg)</i>	<i>228-20</i>	(Gellon et al., 1997)
vkg 177	<i>viking (vkg)</i>	<i>177-27</i>	(Gellon et al., 1997)
P2362	<i>wing blister (wb)</i>	<i>09437</i>	(Martin et al., 1999)

### 2.2.5.2.3. Drittachromosomale Mutanten

Stammnummer	Einzelmutationen	Allel	Referenz
P1685	<i>divison abnormally delayed (dally)</i>	<i>06464</i>	(Nakato et al., 1995)
Lan A 9-32	<i>Laminin A (lanA)</i>	<i>9-32</i>	(Henchcliffe et al., 1993)
P1657	<i>Tenascin major (ten a)</i>	<i>05309</i>	(Baumgartner et al., 1994)

### 2.2.5.3. GAL4 Aktivatorlinien

Stamm	Expressionsmuster/ Promotor	Chromosom	Referenz/Herkunft
24B GAL4	<i>myosin-heavy chain</i>	3.	(Schuster et al., 1996)
<i>rho</i> GAL4	<i>rhomboid</i>	2. bzw. 3.	Ip and Levine, unveröffentlicht
<i>da</i> GAL4	<i>daughterless</i>	3.	(Wodarz et al., 1995)
<i>sim</i> GAL4	<i>single-minded</i>	2. bzw. 3.	(Scholz et al., 1997)
<i>sli</i> GAL4	<i>slit</i>	2. bzw. 3.	(Scholz et al., 1997)
<i>elav</i> GAL4	<i>elav</i>	X	(Lin et al., 1994)
<i>sca</i> GAL4	<i>scabrous</i>	2.	(Hinz et al., 1994)
<i>dpp</i> GAL4	<i>decapentaplegic</i>	3.	Bloomington
GMR GAL4	<i>glass</i> Multimer Reporter	2.	Ellis, 1993
<i>ey</i> GAL4	<i>eyeless</i>	2.	Bloomington
<i>en</i> GAL4	<i>engrailed</i>	3.	Bloomington
ML Gal4	ZNS Mittellinie	3.	Urban, unveröffentlicht
<i>Kr</i> Gal4	<i>Krüppel</i>	2.	(Hinz et al., 1994)
117B Gal4	<i>futzi taratzu</i>	3.	Grewe, unveröffentlicht
<i>ap</i> -Gal4	<i>apteruos</i>	2.	Bloomington
<i>btl</i> GAL4	<i>breathless</i>	2.	Schilo, unveröffentlicht

### 2.2.5.4. UAS Effektorlinien und EP-Linien

Stamm	Gen	Chromosom	Referenz
UAS <i>NetrinA</i>	<i>Netrin A</i>	2. bzw. 3.	(Mitchell et al., 1996)
UAS <i>Netrin B</i>	<i>Netrin B</i>	2. bzw. 3.	(Mitchell et al., 1996)
UAS <i>dally</i>	<i>dally</i>	3.	(Jackson et al., 1997)
UAS <i>inf<sup>CG</sup></i>	<i>inflated</i>	3.	(Martin-Bermudo et al., 1997)
UAS <i>MMP1.1</i>	<i>matrix metalloprotease 1.1</i>	2. bzw. 3.	(Page-McCaw et al., 2003)

UAS <i>MMP1.2</i>	<i>matrix metalloprotease 1.2</i>	2. bzw.3.	(Page-McCaw et al., 2003)
UAS <i>MMP2</i>	<i>matrix metalloprotease 2</i>	2. bzw. 3.	(Page-McCaw et al., 2003)
UAS <i>TIMP</i>	<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>	2.	Bloomington
EP 3678	<i>laminin <math>\alpha</math> 3,5</i>	3.	Bloomington
EP 903	<i>laminin <math>\alpha</math> 3,5</i>	3.	Bloomington
EP 664	<i>laminin <math>\alpha</math> 3,5</i>	3.	Bloomington
EP 2178	<i>laminin <math>\beta</math></i>	2.	Bloomington
EP 2553	<i>collagen IV <math>\alpha</math>1 (CgC25)</i>	2.	Szeged Stock Center
EP 2181	<i>collagen IV <math>\alpha</math>2 (viking)</i>	2.	Szeged Stock Center
EP 3051	<i>tenascin-m</i>	3.	Bloomington
EP 1447	<i>troll</i>	X	Bloomington
EP 1619	<i>troll</i>	X	Bloomington
EP 634	<i>dally</i>	3.	Bloomington
EP 581	<i>dally</i>	3.	Bloomington
EP 1365	<i>integrin <math>\alpha</math> PS1 (mew)</i>	X	Bloomington
EP 2235	<i>integrin <math>\beta</math>-new PS</i>	2.	Szeged Stock Center
EP 439	<i>integrin <math>\beta</math> PS (mys)</i>	X	Bloomington
EP 1033	<i>integrin <math>\beta</math> PS (mys)</i>	X	Bloomington
EP 2591	<i>integrin <math>\alpha</math> PS 3 (scab)</i>	2.	Bloomington
EP 2410	<i>syndecan</i>	2.	Szeged Stock Center
EP 2641	<i>syndecan</i>	2.	Szeged Stock Center
EP 2047	<i>syndecan</i>	2.	Szeged Stock Center
EP 2218	<i>syndecan</i>	2.	Szeged Stock Center

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. Genetische Methoden**

#### **2.3.1.1. Fliegenzucht**

Alle Fliegenstämme wurden auf *Drosophila* Futtermedium in Standardplastiktöpfen bei 25 °C gehalten. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte jungfräuliche Weibchen und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

#### **2.3.1.2. Sammeln von Embryonen**

Für Einzel-Eiablagen wurden die Fliegen in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Apfelsaftagarplatte verschlossen wurde. Diese wurde zuvor mit etwas frisch angerührter Bäckerhefe bestrichen. Die Apfelsaftagarplatte wurde alle 12 h gewechselt und für maximal 2 Tage bei 4°C bis zur Fixierung gelagert.

Für Massen-Eiablagen wurde das Färbeblocksystem verwendet (Hummel et al., 1997). Dabei besteht ein Plexiglasblock aus Boden- und Deckelteil mit je 30 Bohrungen mit einem Durchmesser von 1,6 cm, die mit einer engmaschigen Gaze verschlossen werden. Boden- und Deckelteil zusammengesetzt bilden so 30 Ablageröhrchen für Fliegenstämme. Der Block wird in eine CO<sub>2</sub>-Kammer gestellt und die Fliegen werden mit Trichtern in die einzelnen Kammern eingefüllt und gleichzeitig narkotisiert. Der Block wird danach mit der anderen Hälfte verschlossen. Nach dem Erwachen der Fliegen wird die Gaze einer Seite von außen mit Bäckerhefe bestrichen und der Block wird mit der bestrichenen Seite nach unten auf eine Apfelsaftagarplatte aufgesetzt. Die Eiablagen werden alle 12 h gewechselt, wobei nur die behefte Seite der Ablagen gegen eine neue getauscht wird. Die Hefe wird von den Ablagen mit kaltem Leitungswasser abgespült und die Ablagen werden maximal 2 Tage bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

### **2.3.1.3. Keimbahntransformation**

Zur Keimbahntransformation wurde ein Eppendorf Transjektor 5246 eingesetzt. Für die Injektionen wurden nachgeschliffene femtotipII-Kanülen verwendet. Vor dem Einsetzen in das Injektionssystem wird die femtotipII-Kanüle mit 5 µl Injektionsmix befüllt.

#### **2.3.1.3.1. Präparation der Embryonen**

Zur Injektion werden  $w^{1118}$ -Embryonen verwendet. Dazu werden  $w^{1118}$ -Fliegen auf Apfelsaftagarplatten zur Ablage gesetzt. Die Platten werden ein- bis zweimal pro Stunde gewechselt und die Embryonen direkt zur Injektion verwendet. Zur Dechorionisierung werden die Embryonen in 2,5 % NaOCl für 2 min inkubiert und dann - gründlichst mit Wasser gewaschen - auf einen Apfelsaftagarblock transferiert. Mit einer Präpariernadel werden die Embryonen in einheitlicher Orientierung auf dem Apfelsaftagarblock aufgereiht. Etwa 50 bis 70 Embryonen werden dann mit einem Heptankleber bestrichenem Deckglas aufgenommen, indem das Deckglas ohne Druck auf die Embryonen aufgelegt und wieder abgehoben wird. Die Embryonen wurden nun für 5-15 min (abhängig von der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit) luftgetrocknet, bis sich beim vorsichtigen Berühren mit der Präparationsnadel Falten in der Vitellinmembran zeigen. Dann werden die Embryonen mit 10S Öl (Votalef) überschichtet, das Deckglas wird mit 10S-Öl auf einem Objektträger montiert, und die Embryonen werden zur Injektion verwendet.

#### **2.3.1.3.2. Injektion der Embryonen**

Embryonen und Injektionskanüle werden im Gesichtsfeld eines Mikroskops in einer Ebene ausgerichtet. Injektionen erfolgen nur in Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm Stadium befinden. Die Kanüle wird in den posterioren Pol des Embryos gestochen und durch Betätigen der Injektionstaste des Transjektors wird eine kleine Menge des Injektionsmixes in den Embryo injiziert. Die erfolgreiche Injektion kann anhand der roten Farbe des Injektionsmixes nachvollzogen werden. Nach der Injektion wird das Deckglas in ein Wägeschälchen überführt und mit 3S Öl (Votalev) überschichtet. Die Embryonen werden bis zum Schlüpfen bei RT gehalten.

Geschlüpfte L1 Larven werden mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila* Standardmedium überführt.

#### **2.3.1.3.3. Selektion transgener Fliegen**

Die geschlüpften Fliegen werden einzeln gegen Doppelbalancer ( $w^-$ ; *Sp/CyO*; *TM2/MKRS*) gekreuzt. In der F1 Generation können die transgenen Tiere anhand der Augenfarbe ( $w^+$ ) identifiziert werden. Die Stärke der Expression des  $w^+$ -Gens hängt vom Insertionsort ab, so daß die Augenfarbe zwischen gelb und rot variieren kann.

#### **2.3.1.3.4. Lokalisation der Insertionen**

Zur Bestimmung des Chromosoms, auf dem die Insertion stattgefunden hat, werden die Transgene erneut gegen Doppelbalancer gekreuzt. Anhand der Segregation der dominanten Marker und der  $w^+$ -Markierung der transgenen Fliegen kann das Chromosom, das die Insertion des jeweiligen Konstruktes trägt, identifiziert werden.

### **2.3.2. Histologische Methoden**

#### **2.3.2.1. *whole mount* Antikörperfärbung von *Drosophila* Embryonen**

##### **2.3.2.1.1. Antikörperfärbung von Einzelablagen**

Für Antikörperfärbungen an Embryonen aus Einzelablagen wurden die Embryonen auf verschiedene Arten fixiert. Zunächst wird die Standardmethode, Fixierung mit Formaldehyd beschrieben.

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Überführen der MWP in Heptan



- Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml)
- Zugabe des gleichen Volumens an Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von Methanol
- Devitellinisierung der Embryonen durch Vortexen für ca. 30 sek
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln
- Abnahme des Methanols und einmaliges Waschen mit 96 % Ethanol
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation in 10 % Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation des primären AK (Antikörper) in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT ü. N. bei 4 °C auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2-3 h bei RT auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Antikörperspezifische Nachweisreaktionen folgen

#### **Fixierung mit Paraformaldehyd:**

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Überführen der MWP in Heptan
- Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml)
- Zugabe des gleichen Volumens an Fixans (4 % Paraformaldehyd/PBS)
- Fixierung auf 37°C für 20 min
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase

- Zugabe von mind. -20 °C kaltem 80% Ethanol
- 30 sec Vortexen
- erneute Zugabe von -20°C kaltem 80% Ethanol und erneutes Vortexen
- Rehydrierung über eine Ethanolreihe
- Überführung der Embryonen in PBT
- weiteres Vorgehen siehe oben

#### **Hitzefixierung:**

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Aufheizen von Hitzefixierungs-Lösung im Wasserbad in einem verschliessbaren Gefäss
- Überführung der dechorionisierten Embryonen in die heisse Fixierungs-Lösung
- kurzes Schütteln
- unmittelbar eisgekühlte Fixierungslösung hinzugeben
- Inkubation auf Eis für ca. 1min
- Fixierungs-Lösung abnehmen
- Methanol und Heptan im gleichen Verhältnis auf die Embryonen geben
- Devitelinisierung durch kurzes Schütteln
- weiteres Vorgehen siehe oben

#### **2.3.2.1.2. Antikörperfärbung von Massen-Eiablagen (Hummel et al., 1997)**

- Entfernen der Hefe durch Waschen der Plexiglasbox mit Leitungswasser
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Überführen der Plexiglasbox in Heptanfix und Fixierung für 10-15 min
- Überführen der Plexiglasbox in eine Schüttelbox mit Heptanfixans und Methanol (1:1)
- Devitellinsierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln der verschlossenen Schüttelbox für ca. 20 sek

- Waschen der Plexiglasbox in Methanol für ca. 20 sek, danach für ca. 1 min in 96 % Ethanol
- Überführen der Plexiglasbox in PBT und gründliches Waschen mit PBT
- Absaugen der Vitellinmembranen an der Oberfläche mit der Wasserstrahlpumpe
- Umspülen der Embryonen mit Leitungswasser in eine flache Inkubationsschale
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation in 10 % GS/PBT (15 ml) für 1 h bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation des primären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT ü.N bei 4 °C auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2-3 h bei RT auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Antikörperspezifische Nachweisreaktionen folgen

### **2.3.2.2. Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben**

Mit zwei Pinzetten wird am Mundhaken sowie am hinteren Ende des vorderen Drittels einer L3 Larve angesetzt und die Larve wird vorsichtig auseinandergezogen. Der Epidermis der Kopfregion der Larve wird anschliessend umgestülpt und Reste des Darms, die Speicheldrüsen sowie Fettgewebe werden entfernt. Idealerweise bleiben die Flügelimaginalscheiben (FIS) mit der Epidermis assoziiert. In diesem Verband sind die FIS schwer genug, um während der Waschschriffe abzusinken und gleichzeitig ausreichend für die Fixierung exponiert. Die so präparierten Scheiben werden auf Eis in PBS gesammelt.

- Überführen der FIS in Reaktionsgefäße mit Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung in 4 % Formaldehyd/PBS für 20-30 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme des Fixans und Waschen dreimal kurz mit PBS

- Waschen dreimal für 20 min in PBT auf einem Schüttler
- Fortführung des Protokolls siehe Antikörperfärbung an Embryonen (ab: Inkubation in 10% GS/PBT)

Nach der antikörperspezifischen Nachweisreaktion werden die FIS in entsprechende Medien eingebettet. Dann erst werden die eigentlichen FIS mittels Präpariernadeln ausgerichtet und von dem übrigen Geweben getrennt. Die FIS werden mit einem Deckglas eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

### **2.3.2.3. Antikörperspezifische Nachweisreaktionen**

#### **2.3.2.3.1. Alkalische Phosphatase (AP) Färbung**

- Waschen der Embryonen zweimal 5 min in NBT Puffer auf einem Schüttler
- Inkubation in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT-Puffer
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Überführen der Embryonen in 70 % Glycerin

#### **2.3.2.3.2. Meerrettichperoxidase (HRP) Färbung**

- Waschen der Embryonen einmal kurz in PBT
- Inkubation der Embryonen in 0,3 mg/ml DAB-Lösung in PBS und 1,5 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Überführen der Embryonen in 70 % Glycerin

#### **2.3.2.3.3. Präabsorption des anti-β-Galaktosidase Antikörpers**

- Fixierung der Embryonen wie bei der *whole mount* Antikörperfärbung
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation in 10% GS/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler

- Inkubation des anti- $\beta$ -Galaktosidase AK (Verdünnung 1:500) in 10 % GS/PBT ü. N. bei 4°C auf einem Schüttler
- Sterilfiltration des Überstandes, bei 4°C lagern (größere Aliquots bei -20 °C einfrieren) und bei Bedarf in einer Verdünnung von 1:10 einsetzen

#### **2.3.2.4. *whole mount in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen**

Ab dem Schritt der Hybridisierung bis zum Stoppen der Färbereaktion wird DEPC-PBT/PBS und DEPC-NBT Puffer verwendet.

##### **2.3.2.4.1. Fixierung der Embryonen**

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Überführen der MWP in Heptan
- Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml Glasröhrchen
- Zugabe des gleichen Volumens an Fixans (4 bis 8 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 30 min bei RT auf einem Schüttler (1. Fixierung)
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- Devitellinisierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln für ca. 20 sek
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln
- Waschen der Embryonen mit 96 % Ethanol (nach diesem Schritt können die Embryonen bis zu einer weiteren Verwendung in Ethanol bei -20 °C gelagert werden)

#### **2.3.2.4.2.      Hybridisierung der Embryonen**

- Waschen zweimal 5 min in PBT
- Inkubation in 95 °C – 100 °C heißem Wasser für 6 min, dabei zwei- bis dreimal invertieren
- Inkubation für 15 min auf Eis
- Waschen zweimal kurz in PBT
- Fixierung für 20 min in 5% Formaldehyd/PBT bei RT auf einem Schüttler (2. Fixierung)
- Waschen dreimal 2 min mit PBT
- Waschen für 5 min mit PBT/Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1
- Waschen für 5 min mit Hybridisierungspuffer
- Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei 60 °C für mind. 80 min
- RNA-Probe in 30 µl Hybridisierungslösung für 2 min bei 90° denaturieren, dann direkt auf Eis stellen
- Abnehmen der Hybridisierungslösung von den Embryonen
- Zugabe der denaturierten RNA-Probe, Inkubation bei 60 °C ü. N.
- Waschen für 30 min in Hybridisierungspuffer bei 60 °C
- Waschen für 30 min in Hybridisierungspuffer/PBT bei 60 °C
- Waschen der Embryonen fünfmal 20 min mit PBT 60°C
- Waschen für 10 min in PBT bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation mit anti Digoxigenin AP Antikörper/PBT (1:2000) für 2 h bei RT auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen fünfmal 20 min mit PBT bei 60 °C

#### **2.3.2.4.3.      Nachweisreaktion**

- Waschen zweimal für 5 min in NBT Puffer auf einem Schüttler bei RT
- Embryonen in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

#### **2.3.2.4.4. Einbetten der Embryonen**

- Entwässern der Embryonen in einer Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % Ethanol) für je 2 min
- Ein Tropfen Kanadabalsam-Methylsalicylat (4:1) wird auf einen Objektträger gegeben
- Embryonen werden in 100 % Ethanol in eine Pipette aufgenommen und zügig werden einige in die Mitte des Kanadabalsam-Methylsalicylat Tropfens plaziert und ggf. mit einer Präpariernadel schnell verteilt
- Deckglas auflegen

#### **2.3.3. Molekularbiologische Methoden**

##### **2.3.3.1. Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde**

- In ein eisgekühltes Reaktionsgefäß werden gegeben:
- 1 µg linearisierte Plasmid DNA (mit RNA Polymerasepromotoren)
- 2 µl 10 x DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)
- ad 18 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O
- 2 µl RNA Polymerase (SP6, T7 oder T3) (Roche)
  
- Mischen und kurz abzentrifugieren
- Inkubation für 2 h bei 37 °C
- Zugabe von 2 µl DNaseI, RNase-frei, zur Entfernung der Template-DNA
- Inkubation für 15 min bei 37 °C
- Abstoppen der Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0
- Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl EtOH (-20°C)
- Mischen und bei -20 °C 2 h (oder -70°C 30 min) fällen
- Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 12.000 g
- Waschen mit 50 µl 70 % EtOH, trocknen und in 100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufnehmen
- Einfrieren bis zur Verwendung bei -20 °C

### **2.3.3.2. Herstellung elektrokompenter Zellen (XL-1blue oder DH5-alpha *Escherichia coli*)**

- Animpfen von sechsmal 0,5 l LB Medium mit 5 ml einer frischen ü. N. Kultur
- Inkubation im Schüttler bei 37°C (3-5 h) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6
- Lagerung der Kultur 15-20 min auf Eis
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 5.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in kaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 5.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet erneut kaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 5.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 5.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in ca. 2 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH<sub>2</sub>O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca. 1-3 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml)
- Aliquotieren der Suspension in je 50 µl Einheiten und sofort bei -70 °C lagern

### **2.3.3.3. Bakterientransformation (Elektrotransformation)**

Die Transformationen von DNA in elektrokompente *Escherichia coli* Stämme wurden mit dem Gene-Pulser der Firma BIORAD nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- Auftauen kompetenter Zellen auf Eis
- Mischen der 50 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA Menge
- Überführen in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette
- Einsetzen der Küvette in Gene Pulser (BIORAD)



- Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellungen am Gene Pulser: Kapazität -25  $\mu$ F, Spannung -1,8 KV, Widerstand -200  $\Omega$ )
- Küvette schnell entnehmen und 300  $\mu$ l vorgewärmtes SOC-Medium zugeben
- Inkubation im Schüttler bei 37 °C für 30 min
- Ausstreichen auf einem geeigneten Selektionsmedium und bei 37 °C ü.N. kultivieren

#### **2.3.3.4. DNA Restriktionen**

Die DNA Restriktionen erfolgten gemäß Herstellerangaben (Roche).

#### **2.3.3.5. Gelelektrophorese**

Die Trennung der DNA Fragmente erfolgte bei 100 - 150 V durch Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen (0,8 bis 1,2 % in TBE) mit Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml H<sub>2</sub>O davon 4  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung/100ml Agarosegel). Als relatives Maß für die Größe der DNA Fragmente diente eine 1 kb-Leiter (GIBCO/BRL).

#### **2.3.3.6. Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel**

Die Agarosegelelektrophorese wurde bei niedriger Spannung durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen. Die Arbeiten wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### **2.3.3.7. Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen**

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen wurde ein zweckmäßiges Volumen auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Standard diente 1  $\mu$ g einer 1 kb-Leiter (Gibco/BRL). Die Konzentration der DNA Lösung wird durch einen Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten unter UV-Licht bestimmt. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf).

### 2.3.3.8. Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation wurden der Vektor und das zu klonierende Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:4 eingesetzt. Bei einer Restriktion des Vektors mit nur einem Enzym muß dieser vor der Ligation zur Verhinderung einer Vektorreligation mit SAP (1 µg/µl Shrimps Alkaline Phosphatase, Roche) dephosphoryliert werden. Bei einer Doppelrestriktion kann darauf verzichtet werden.

Ligationsansatz:      100 ng            Vektor DNA  
                              1-4fache        molare Menge des DNA Fragments  
                              2 µl             10 x Ligationspuffer (Promega)  
                              1 µl             T4 DNA Ligase (Promega)  
                              ad 20 µl H<sub>2</sub>O  
                              Inkubation 1 h bei 37 °C oder ü.N. bei 16 °C

### 2.3.3.9. Mini-Präparation von Plasmid DNA

- Animpfen von 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum zur Selektion) mit Einzelkolonien
- Inkubation ü.N. bei 37 °C im Schüttler
- Überführen von ca. 1,5 ml Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß, den Rest kühl lagern
- Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 10 sek bei 13.000 rpm und den Überstand abnehmen
- Pellet durch Vortexen lösen
- Zugabe von 400 µl STET zum gelösten Pellet
- Kochen für 1 min, anschließend in einer Tischzentrifuge 7 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand zu 400 µl Isopropanol in ein neues Reaktionsgefäß schütten und kurz invertieren
- Fällung in einer Tischzentrifuge für 8 min bei 13.000 rpm
- Pellet mit 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase-H<sub>2</sub>O resuspendieren

### 2.3.3.10. Midi-Präparation von Plasmid DNA

Die Präparation größerer DNA Mengen erfolgte aus einer 50 ml ü.N. Kultur. Hierfür wurde ein DNA Präparationskit der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.3.3.11. Standard PCR

Für Standard Amplifikationen wurde Plasmid DNA nach Mini oder Midi Präparation eingesetzt. Für die Amplifikation wurde folgender Reaktionsansatz (50 µl) angesetzt:

Template	ca. 0,1 mg/ml	1 µl
10 x Puffer	1x	5 µl
dNTP	0,2 mM	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	3 µl
Primer A (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Primer B (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
TaqDNA Polymerase	1U	0,2 µl
steriles ddH <sub>2</sub> O		ad 50 µl

Alle Amplifikationen wurden auf einem MJ Research PTC 200 DNA-Engine (Fa. Biozym) im „calculated“ Temperaturmodus durchgeführt.

Das verwendete Temperaturprofil richtet sich nach der Länge des PCR Produktes, den Annealing-Temperaturen der Primer und nach der Menge der eingesetzten Template DNA. Die Temperaturprofile werden entsprechend variiert.

Standard-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C	3:00 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
Annealing (je nach Primerpaar)	60 °C (variabel)	0:15 min
Extension	72 °C	2:30 min (variabel)
Wiederholung der Schritte 2 - 4		30x

finale Extension	72 °C	10:00 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

### **2.3.3.12. Sequenzierung**

Die meisten Sequenzierungen wurden mit dem Amersham Sequenzierungskit (*Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem ABIPRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Neuere Sequenzierungen erfolgten mit dem Sequenzierungskit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham, Biosciences). Die Auswertung dieser Sequenzreaktionen wurden mit dem MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Zur Analyse der Sequenzdaten wurde das Programm *Lasergene DNA STAR Software Package* (GATC, Konstanz) verwendet.

### **2.3.4. Biochemische Methoden**

#### **2.3.4.1. Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten**

Embryonen werden mit PBT in MWP überführt mit 5 % NaOCl für 4 min dechorionisiert, dann gründlich mit Wasser gewaschen und in Reaktionsgefäße überführt. Nach Abnahme des Überstandes wird das doppelte Volumen der Embryonenmenge in Lysispuffer zugegeben. Unter Hinzugabe von 0,5 % Triton werden die Embryonen auf Eis mit einem Pistill zerkleinert und anschließend bei 4 °C und 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wird die Phase zwischen Pellet und entstandener Fettschicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt (der Zentrifugationsschritt kann bei ungenügender Trennung wiederholt werden).

Alternativ werden Embryonen nach der Dechorionisierung in 5% NaOCl direkt in SDS-Probenpuffer mit einem Pistill zerkleinert. Die Embryonen wurden zuvor sortiert, beispielsweise mittels eines GFP-Balancers, und es werden ca. 30 Embryonen in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend werden die

Embryonen zerkleinert und die Probe direkt aufgekocht. Die Proteinextrakte können direkt weiterverarbeitet werden.

#### **2.3.4.2. Gewinnung von Schneiderzell Proteinextrakten**

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus *Drosophila* Schneiderzellen werden transfizierte oder untransfizierte Zellen aus 6fach Multiwellplatten geerntet.

- Überstand mit S2-Zellen ernten und in 5ml Zentrifugengefäße überführen
- Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min
- Überstand verwerfen
- pro well 150µl Lysispuffer hinzugeben
- Zellen in Lysispuffer resuspendieren und in ein Mikroreaktionsgefäß überführen
- mit Pistill Zellen auf Eis zerkleinern
- kurz stehen lassen
- Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm für 10min
- Überführung des Überstandes in ein neues Mikroreaktionsgefäß und Aufbewahrung bei -20°C

#### **2.3.4.3. Konzentrationsbestimmung und Vorbereitung von Proteinextrakten für die Gelelektrophorese**

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte nach der Bradford-Methode. Hierzu wird das Bradfordreagenz 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. 1 bis 10 µl der zu testenden Lösung werden mit je 1 ml des Reagenz gemischt und nach 10 min Inkubationszeit photometrisch gemessen (Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm). Pro Gelspur sollten etwa 20 µg Protein aufgetragen werden. Zur Vorbereitung der Proben werden diese mit Probenpuffer verdünnt (je nach Konzentration des Probenpuffers; meistens wurde ein 5fach Puffer verwendet) und für 5 min bei ca. 100 °C denaturiert. Vor dem Gelauftrag werden die Proben 1min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

#### **2.3.4.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen. Es wurden Gelelektrophorese-Apparaturen der Firma Hoefer verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden die SE 20 Mini-Zellen mit 0,75 mm dicken Spacern benutzt. Nach dem Polymerisationsstart des Trenngels durch Zugabe von APS und TEMED wird es bis auf 2/3 der gesamten Höhe der Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 1 h wird das Isopropanol abgegossen und durch die Sammelgellösung (plus APS und TEMED) ersetzt. Der Probenkamm wird direkt danach eingesetzt. Die Polymerisation des Gel erfolgt für ca. 30 min.

Nach dem Auftrag der Proben erfolgt die Gelelektrophorese bei 20 mA für ca. 2 h. Die Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgt durch einen Vergleich mit standardisierten Markerproteinen. Die Proteinbanden auf dem SDS Gel können mit kolloidalem Coomassie angefärbt oder über Western-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

#### **2.3.4.5. Western-Blotting und Immunodetektion von Proteinen**

Der Proteintransfer von SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Tank-Blot-Einheit der Firma Hoefer gemäß Herstellerangaben. Die PVDF-Membran wird 10 sek in Methanol aktiviert, 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 7 min in Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer geschieht für 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA. Die Membran wird anschließend mit Ponceau S Lösung reversibel gefärbt, um signifikante Größen des Markers anzuzeichnen. Die Membran wird mit TBS Tween entfärbt und 30 min in 10 % Milchpulver geblockt. Der verwendete Antikörper wird in geeigneter Konzentration in 10 % Milchpulver verdünnt, und die Membran wird in dieser Lösung bei 4 °C ü.N. auf dem Rolltaumler inkubiert. Die Membran wird fünfmal 15 min in TBS Tween gewaschen und mit einem HRP gekoppelten Zweitantikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wird dieser fünfmal 15 min in TBS Tween heruntergewaschen. Zum Nachweis der Antigene wurde das ECL-Western-Blotting-Detektionssystem der Firma Amersham gemäß Herstellerangaben verwendet.

### **2.3.5. Zellkultur**

Zellkulturexperimente wurden an *Drosophila* Schneider-2plus-Zellen (S2+) (Invitrogen) durchgeführt.

#### **2.3.5.1. Kultivierung von S2 Zellen**

Die S2 Zellen wurden in 10 ml Schneiders *Drosophila* Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS bei 25 °C kultiviert. Das Medium enthielt zudem 50 Units Penicillin und 50 Units Streptomycin-Sulfat pro ml. Bei einer Zelldichte von  $6 \times 10^6$  bis  $20 \times 10^6$  wurden die Zellen 1:5 verdünnt in eine neue Kulturflasche passagiert.

#### **2.3.5.2. Antikörperfärbung an S2 Zellen**

Um die Adhärenz der Zellen zu verbessern, wurden die Deckgläschen mit Fibronectin (1:100 in PBS) beschichtet.

Die Saat der Zellen erfolgte in 24 Well Platten auf den beschichteten Deckgläschen mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium. Die Zellen werden ü.N. bei 25 °C kultiviert. Nach Abnahme des Mediums erfolgt die Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (500 µl/Well) für 15 min. Die Zellen werden dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und dann 3 min mit 0,5% Triton X-100/PBS (500 µl/Well) permeabilisiert. Es folgt zweimaliges Waschen mit PBS für 5 min und Blocken für 1 h in 3 % BSA in PBS. Die Inkubation des primären Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 3 % BSA in PBS geschieht für 2 h bei RT (500 µl/Well). Dieser wird anschließend dreimal für 10 min mit PBS heruntergewaschen. Der sekundäre Antikörper (1:100 bis 1:2000) in 3 % BSA in PBS folgt für 1 h bei Raumtemperatur. Danach werden die Deckgläschen mit PBS dreimal für 5 min gewaschen, einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und umgekehrt in entsprechendes Medium auf einem Objektträger eingebettet.

#### **2.3.5.3. Transfektion von S2 Zellen**

Die Zellen werden wie beschrieben gesät und ü.N. bei 25 °C inkubiert. Pro Well wird ein Transfektionsansatz vorbereitet:

- 100 µl Schneiders Medium (--),
- 3 µl Fu Gene 6s / µg DNA,

## Material und Methoden

- je 0,5 µg der zu transfizierenden DNA (z.B. UAS Konstrukt und *actGAL4* mischen und zugeben).
- 15 min bei RT stehen lassen.

Nach Abnahme des Überstands werden 100 µl des Transfektionsansatzes mit 400 µl Schneiders Medium (++) pro Well zugegeben und ü.N. bei 25 °C inkubiert. Die transfizierten Zellen werden nach zwei Tagen fixiert und gefärbt (siehe oben).



### **3. Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Bedeutung von sezernierten Signalmolekülen in der Entwicklung des embryonalen zentralen Nervensystems (ZNS) von *Drosophila*. Hierzu wurde, ausgehend von eigenen Vorarbeiten, zunächst die Rolle der Extrazellulären Matrix (ECM) für die ZNS-Entwicklung untersucht. Desweiteren wurde die Funktion der sezernierten Signalmoleküle, NETRIN und SLIT, genauer betrachtet.

#### **3.1. Extrazelluläre Matrix (ECM)**

In der Entwicklung des ZNS von *Drosophila* spielen die sezernierten Proteine NETRIN und SLIT eine bedeutende Rolle. Die Sezernierung dieser Proteine erfolgt in den extrazellulären Raum (Brose et al., 1999; Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Rothberg et al., 1990). Daher ist bei der Wirkung des NETRIN- und SLIT Signals eine Interaktion mit der ECM zu vermuten. So konnte bereits in Vertebraten und *Drosophila* eine Interaktion einiger ECM-Proteine mit SLIT nachgewiesen werden (Johnson et al., 2004; Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001).

Aus diesem Grund wurde die Bedeutung der ECM in der Entwicklung des ZNS untersucht. Es standen mehrere Mutanten einiger ECM-Komponenten und ECM assoziierter Proteine zur Verfügung, die zunächst phänotypisch charakterisiert wurden. Zudem dienten RNAi-Konstrukte einiger ECM-Komponenten dazu, definierte Genfunktionen zu bestimmten Zeitpunkten auszuschalten. Desweiteren dienten Überexpressionstudien von ECM-Proteinen und ECM modifizierenden Proteinen dazu, die Auswirkung dieser auf die Entwicklung des ZNS zu analysieren.

##### **3.1.1. Phänotypische Charakterisierung von ECM-Mutanten**

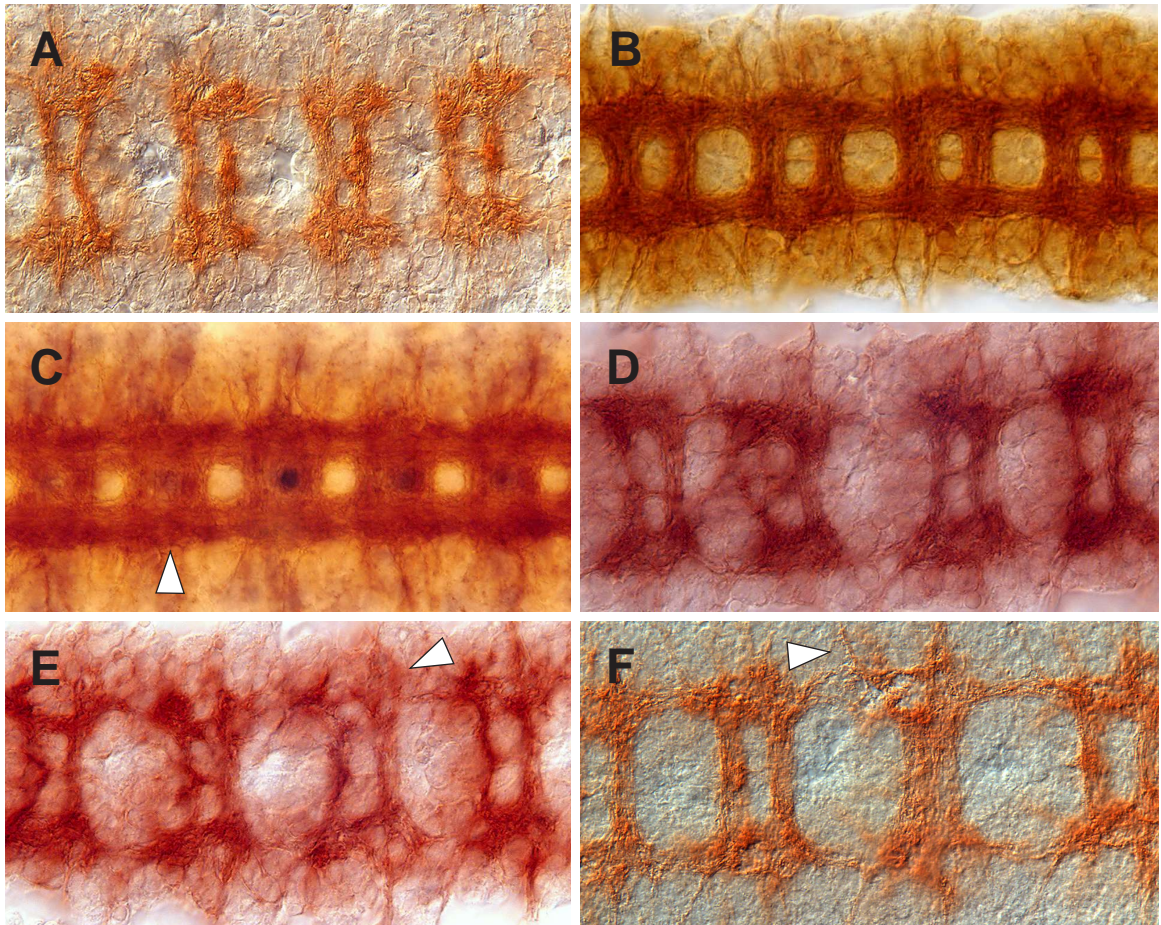
In eigenen Vorarbeiten wurden die unterschiedlichen ECM-Mutanten mit dem monoklonalen Antikörper (MAb) BP102 auf Defekte in der neuronalen Entwicklung hin untersucht. MAb BP102 markiert alle Axone und Dendriten des zentralen Nervensystems. Diese phänotypische Charakterisierung zeigte nur für wenige ECM-Mutanten einen abnormen Phänotyp. Lediglich Mutanten einiger Integrine, die

Rezeptoren der ECM, sowie eine Mutation im Gen *dally*, ein Protein der Glypikan-Familie, zeigen leichte Defekte in der Entwicklung des ZNS (Abb. 3). In *dally* Mutanten sind die Kommissuren verdickt und der interkommissurale Raum ist deutlich verringert (Abb. 3C, Pfeilkopf). Die Mutanten der Integrine  $\alpha$ PS2 (*inflated*) und  $\beta$ PS (*myospheroid*) zeigen in frühen Entwicklungsstadien leichte Defekte im ZNS. In lateralen Bereichen der Neuromere wachsen einige Axone in untypischen Bahnen und die Bereiche wirken "ausgefranzt" (Abb. 3D/F, Pfeilkopf).

In dieser Arbeit wurde die phänotypische Charakterisierung mit weiteren neuronalen Markern wiederholt, die im Gegensatz zu MAb BP102 nur einen Teil der Axone des ZNS markieren. Dazu wurden die monoklonalen Antikörper anti-FASII (MAb 1D4) und anti-FUTSCH (MAb 22C10) verwendet. Dabei markiert anti-FASII die longitudinalen Axonbahnen des ZNS, die sich in späteren Entwicklungsstadien in drei distinkte Faszikel unterteilen lassen (Abb. 4A). Man unterscheidet zwischen den lateralen, intermedialen und medialen Faszikeln. Anti-FUTSCH färbt alle Axone und Somata der Motoneurone des peripheren und zentralen Nervensystems. Zur phänotypischen Charakterisierung wurden Embryonen der mutanten Stämme gesammelt und anschliessend immunohistochemisch untersucht. Durch die Verwendung eines "blauen Balancers" konnten homozygot mutante Embryonen eindeutig identifiziert werden. Die gefärbten Embryonen wurden anschliessend auf Defekte in der ZNS Entwicklung hin untersucht.

Die phänotypische Charakterisierung ergab, dass der Grossteil der untersuchten Mutanten sowohl mit anti-FASII als auch mit anti-FUTSCH keine Defekte in der Entwicklung des embryonalen ZNS zeigte. Tabelle 1 listet die analysierten Mutanten auf und gibt einen Überblick über die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung.

Lediglich mit anti-FASII konnten Defekte in der Entwicklung bei wenigen Mutanten identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Mutationen einiger Gene der Integrin-Familie sowie um die Heparan-Sulfat-Proteoglycane (HSPG) DALLY und SYNDECAN . Abb. 4 zeigt die Defekte in der Entwicklung des ZNS, die nach einer Antikörperfärbung mit anti-FASII beobachtet werden konnten. Für die Integrin-Mutanten  $\alpha$ PS2- (*inflated*),  $\alpha$ PS3- (*scab*) und  $\beta$ PS-Integrin (*myospheroid*) zeigt sich ein deutlicher Phänotyp im embryonalen ZNS. Die longitudinalen Axontrakte erscheinen im Vergleich zum Wildtyp desorganisiert und teilweise ist eine deutliche Defaszikulation der Axontrakte zu beobachten (Abb. 4B, Pfeilkopf). Die Desorganisation der anti-FASII positiven Faszikel zeigt sich zum einen im



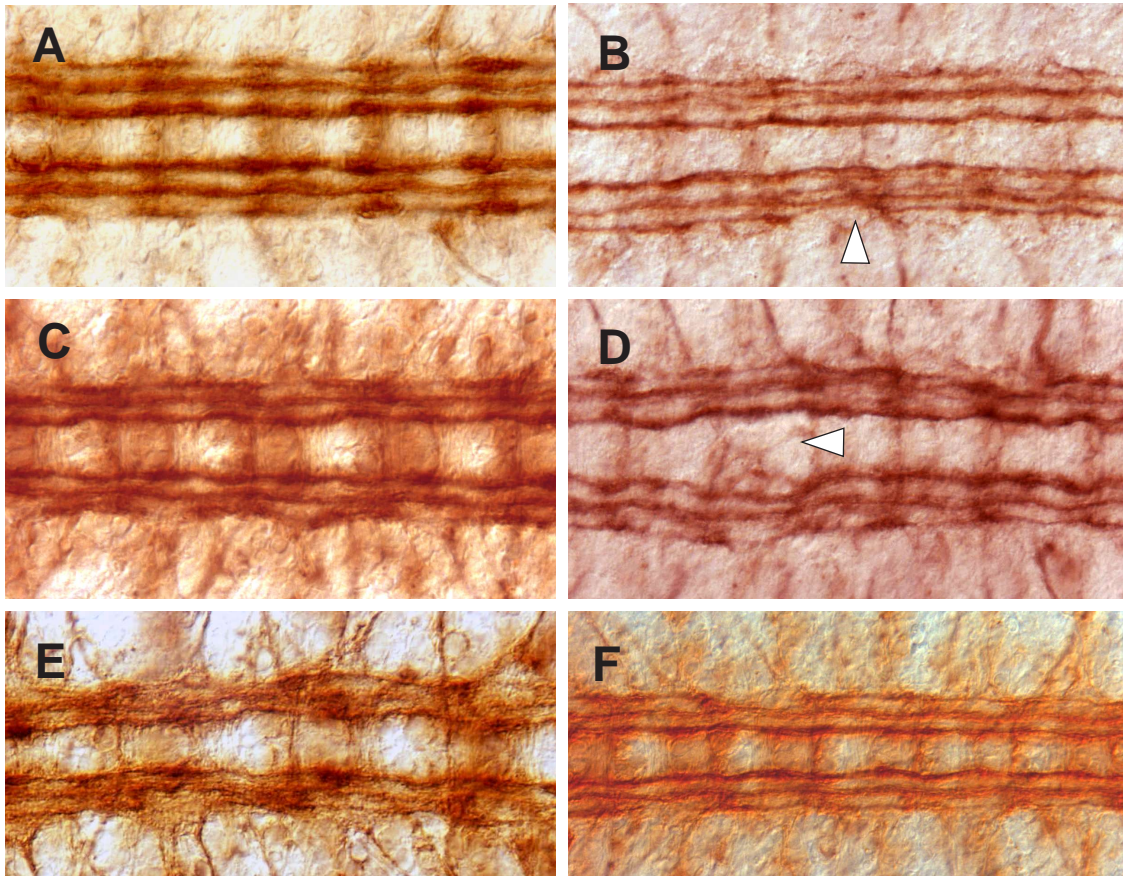
**Abb. 3 Defekte in der Organisation des ZNS durch Mutationen der ECM**  
 Präparation des ventralen ZNS in verschiedenen Entwicklungsstadien; Antikörperfärbung mit MAb BP102, anterior ist links; (A/B) ZNS im Wildtyp, im (A) Stadium 12 und (B) Stadium 16. (C-F) Präparation des ZNS homozygoter Embryonen verschiedener ECM Mutanten; (C) ZNS Defekte in der *dally*<sup>06464</sup> Mutante; in einigen Neuromeren ist eine Fusion der Kommissuren zu beobachten (Pfeilkopf); (D/E) Mutation des  $\beta$ -PS Integrins (*myospheroid*<sup>1</sup>); in frühen Stadien (E) ist eine Desorganisation der ZNS Axone zu erkennen (Pfeilkopf). (F) Die Mutante des  $\alpha$ -PS2 Integrins (*inflated*<sup>B2</sup>) zeigt ebenfalls in der frühen ZNS Entwicklung eine Desorganisation der Axontrakte (Pfeilkopf).

unterschiedlichen Abstand der medialen Faszikel zueinander (Abb. 4D). Zum anderen ist die Projektion der longitudinalen Axontrakte gestört, die hier wellenförmig verlaufen. Innerhalb der Integrin Mutanten prägt sich der beobachtete Phänotyp in der *scab*-Mutante am stärksten aus. Mutationen von *myospheroid* und *inflated* haben hingegen einen geringeren Einfluss auf die Entwicklung des ZNS.

Tab. 1: Auflistung der phänotypisch charakterisierten ECM-Mutanten. Weitere Informationen über die verwendeten Stämme finden sich im Anhang.

Gene	Genprodukt	Defekte ?
<b>ECM-Proteine</b>		
<i>laminin A</i>	LAMININ A	nein
wing blister	LAMININ $\alpha$ 2	nein
<i>collagen Typ VI</i>	COLLAGEN IV $\alpha$ 1	nein
m-spondin	SPONDIN	nein
<i>tenascin major</i>	TENASCIN	nein
<i>tiggrin</i>	TIGGRIN	nein
<i>viking</i>	COLLAGEN IV $\alpha$ 2	nein
syndecan	HEPARAN-SULFAT-PROTEOGLYCAN	anti-FASII
perlecan / terribly reduced optic lobes (trol)	HEPARAN-SULFAT-PROTEOGLYCAN	nein
<b>ECM-Rezeptoren</b>		
<i>dally</i>	PROTEOGLYCAN der GLYPICAN-Familie	anti-FASII & MAb BP102
<i>inflated</i>	INTEGRIN $\alpha$ PS2	anti-FASII & MAb BP102
<i>multiple edematous wings</i>	INTEGRIN $\alpha$ PS1	nein
<i>myospheroid</i>	INTEGRIN $\beta$ PS	anti-FASII & MAb BP102
<i>scab</i>	INTEGRIN $\alpha$ PS3/4	anti-FASII

Neben den Integrin-Mutanten zeigt auch eine Mutation im Gen *dally* einen deutlichen Phänotyp im embryonalen ZNS. Auch hier ist im Vergleich zum Wildtyp in anti-FASII-Färbungen eine Desorganisation der longitudinalen Axontrakte zu beobachten (Abb. 4E). Der Phänotyp der *syndecan*-Mutante fällt im Vergleich zu den Integrinen und



**Abb. 4 Defekte in der Organisation des ZNS durch Mutationen der ECM**  
 Präparation des ventralen ZNS im Entwicklungsstadium 16; Antikörperfärbung mit MAb 1D4 (anti-FasII), anterior ist links; (A) ZNS im Wildtyp. (B-F) Präparation des ZNS homozygoter Embryonen verschiedener ECM Mutanten; (B) Die  $\beta$ -PS Integrin Mutante (*myospheroid*<sup>1</sup>) zeigt deutliche Defekte im ZNS; die Axontrakte sind defaszikulierte (Pfeilkopf) und verlaufen in untypischen Bahnen. (C) Mutante des  $\alpha$ -PS2 Integrins (*inflated*<sup>B2</sup>). (D) ZNS-Defekte in der  $\alpha$ -PS3 Integrin (*scab*<sup>2</sup>) Mutante; die longitudinalen Faszikel verlaufen untypisch und der Abstand der Faszikel zueinander variiert (Pfeilkopf). (E) Auch die *dally*<sup>06464</sup> Mutante zeigt Defekte im ZNS. (F) ZNS Phänotyp der *syndecan*<sup>k10215</sup> Mutante.

*dally* deutlich schwächer aus, in einigen Neuromeren ist aber auch in *syndecan*-Mutanten eine Desorganisation der longitudinalen Axontrakte zu beobachten.

### 3.1.1.1. RNAinterference

Für viele der untersuchten ECM-Moleküle wurde eine maternale Komponente nachgewiesen. Um diese maternale Komponente zu umgehen, wurden RNAi-Konstrukte für einige ECM-Moleküle generiert. Eine Weiterentwicklung der ursprünglichen RNAi-Methode ermöglicht es, einzelne Gene durch Nutzung des UAS/Gal4-Systems zellspezifisch auszuschalten. So ist es möglich den Verlust einer Genfunktion zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung und in beliebigen Geweben zu analysieren. Die neuesten RNAi-Vektoren verwenden ein Intron als „Spacer“ zwischen den gegenläufig ausgerichteten Sequenzen. In der Zielzelle kommt es zur Ausbildung von „loopless hairpin“ Doppelstrang RNA-Produkten, die durch einen enzymatischen Mechanismus die Zerstörung der äquivalenten, endogenen mRNA bewirkt (Carthew, 2001; Kennerdell and Carthew, 2000; Lee and Carthew, 2003).

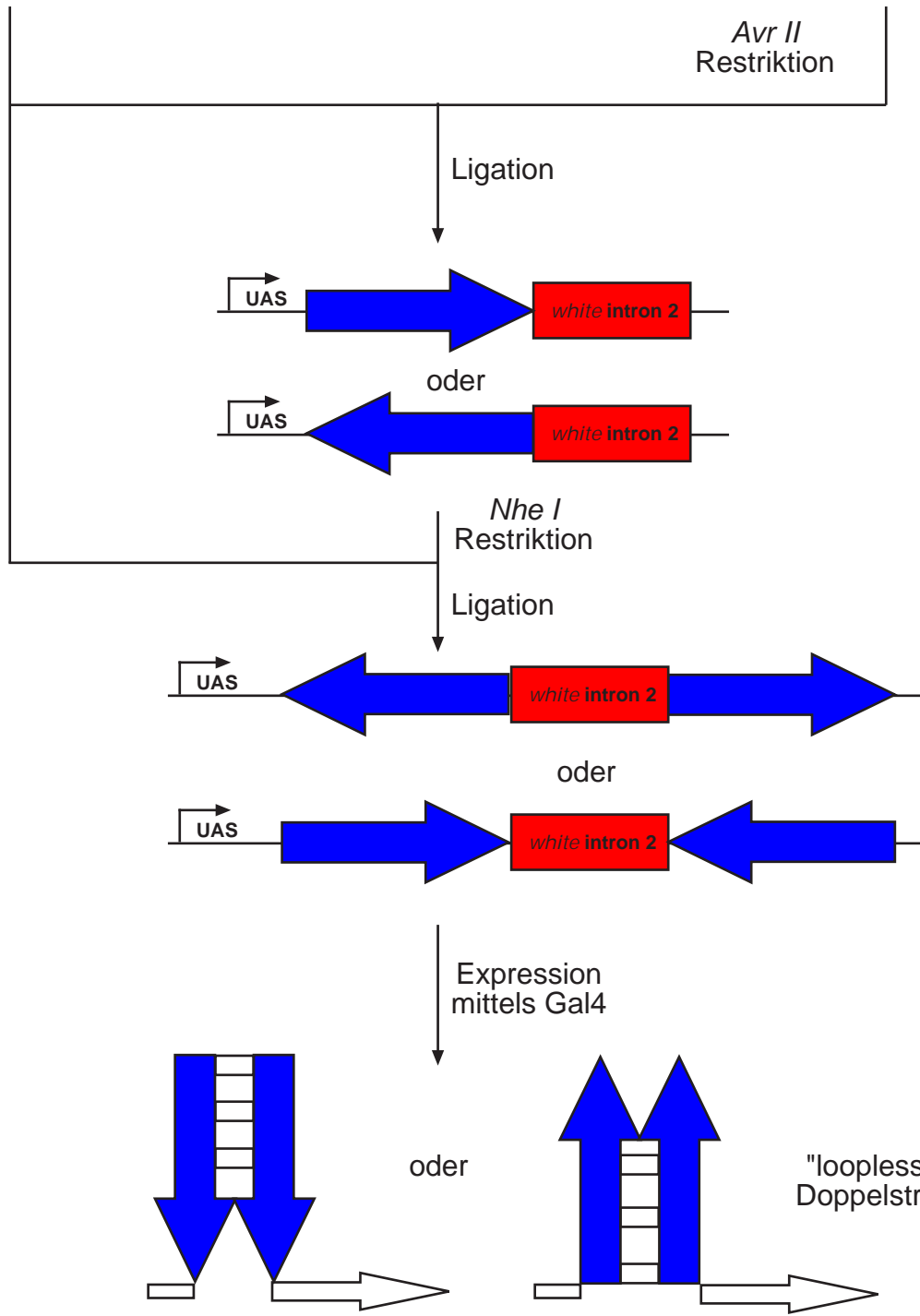
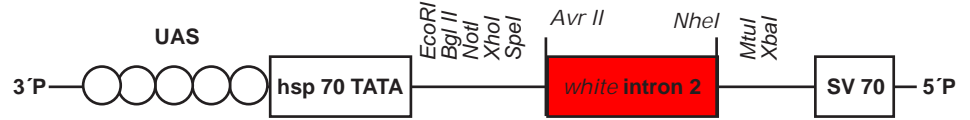
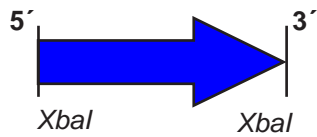
Mit Hilfe des pWiz-Vektors (Lee and Carthew, 2003) wurden für LAMININ A, COLLAGEN (Cg25C; COLLAGEN IV  $\alpha$ 1), DALLY, MYOSPHEROID ( $\beta$ -PS Integrin) und INFLATED ( $\alpha$ -PS2 Integrin) RNAi-Konstrukte generiert. Abb. 5 gibt schematisch die Klonierungsstrategie zur Klonierung von RNAi-Konstrukten mit Hilfe des pWiz-Vektors wieder.

Leider konnte nur das *inflated* RNAi-Konstrukt getestet werden. Für *laminin A*, *collagen*, *dally* und *myospheroid* konnten RNAi-Konstrukte generiert werden, jedoch war bis jetzt die Etablierung transgener Fliegen nicht erfolgreich. Nach erfolgter Keimbahntransformation des *inflated* RNAi-Konstruktes (*If*-RNAi) wurden transgene Fliegenstämme etabliert. Anschließend wurde die Funktionalität des Konstruktes getestet. Mutante *inflated* Zellklone im Flügel führen zu einer Blasenbildung, da sich die Epithelschichten von einander lösen (Brower et al., 1995).

Daher wurde, um die Funktionalität von *If*-RNAi zu testen, *If*-RNAi im *Drosophila* Flügel exprimiert. Hierzu wurden die Gal4-Stämme *ap*-Gal4 (*apterous*) und *en*-Gal4 (*engrailed*) verwendet. Beide Gal4-Treiberlinien erlauben eine Expression in der Flügelimaginalscheibe. Dabei exprimiert *ap*-Gal4 im dorsalen Kompartiment und *en*-Gal4 im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe. Mittels der Expression der Gal4-Treiberlinien konnte eine Phänokopie des beschriebenen *inflated*

PCR Produkt mit artifiziiellen Restriktionsschnittstellen

pWiz-Vektor (9,1 kb)



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Klonierung eines RNAi-Konstruktes mittels des pWiz Vektor**

Ein spezifisches PCR Produkt des zu untersuchenden Gens wird in den Vektor pWiz beiderseits des *white 2* Introns in gegenläufiger Orientierung kloniert. Nach erfolgter Klonierung eines RNAi Konstruktes kann dieses per Keimbahntransformation in die Fliege gebracht und mittels Gal4-Treiberlinien ektopisch exprimiert werden. (Schema modifiziert nach Lee & Carthew, 2002)

Phänotyps generiert werden (Abb. 6A/B; en-Gal4 nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, dass das klonierte *If*-RNAi Konstrukt funktional ist.

Anschließend wurde die Expression von *If*-RNAi im embryonalen ZNS untersucht. Hierzu wurden folgende Gal4-Treiberlinien verwendet: *ML*-Gal4, *sca*-Gal4 (*scabrous*), *sim*-Gal4 (*single minded*), *slit*-Gal4 (*slit*) und *rho*-Gal4 (*rhomboid*). Dabei erlauben die Gal4-Linien *ML*-Gal4, *sim*-Gal4 und *slit*-Gal4 eine Expression in der ZNS-Mittellinie. *sim*-Gal4 wird in allen Mittellinienzellen exprimiert, die *slit*-Gal4 Expression beschränkt sich auf die Mittelliniengliazellen und *ML*-Gal4 exprimiert in einem Grossteil der Mittellinienzellen sowie im Ektoderm. Die Treiberlinien *sca*-Gal4 und *rho*-Gal4 erlauben eine panneurale Expression. *scabrous* wird im kompletten Neuroektoderm und damit in allen Neuroblasten und deren Nachkommen in den Neuronen des embryonalen ZNS, exprimiert. *Rho*-Gal4 exprimiert im Neuroektoderm sowie in Mittelliniengliazellen. Die Embryonen der Kreuzungen von *If*-RNAi gegen unterschiedliche Gal4-Treiber wurden gesammelt und mit anti-FASII auf Defekte in der Entwicklung des ZNS hin untersucht.

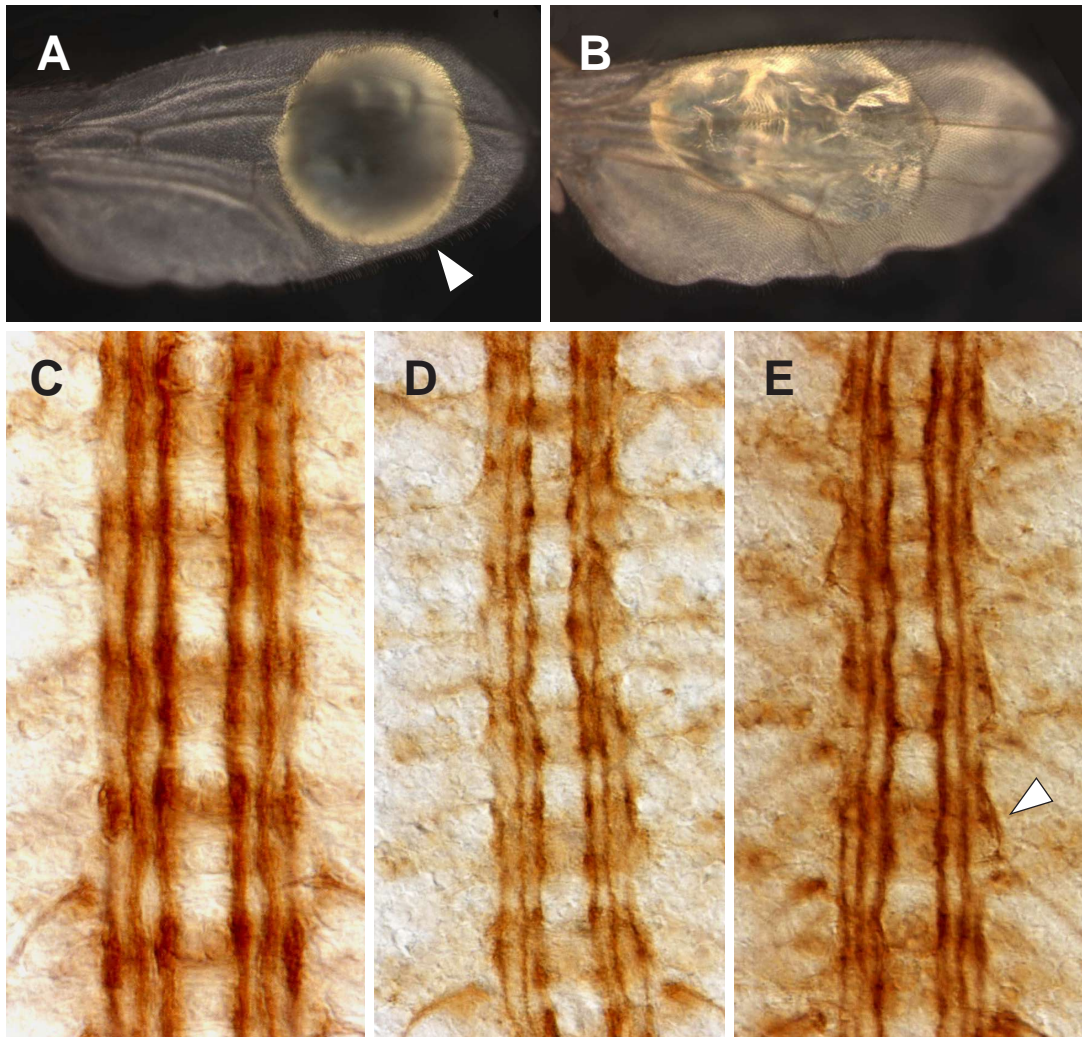
Eine embryonale Expression von *If*-RNAi führt nur in wenigen Fällen zu Defekten im ZNS. Lediglich nach Expression mit Hilfe der Gal4-Linien *ML*-Gal4 und *rho*-Gal4 konnte ein schwacher ZNS Phänotyp beobachtet werden (Abb. 6D/E). Die longitudinalen Axontrakte sind desorganisiert, was anhand der Welligkeit einiger Faszikel zu erkennen ist. Zudem erscheint der Abstand zwischen den medialen Faszikeln im Vergleich zum Wildtyp geringer zu sein und das ZNS wirkt schmaler. Insbesondere nach einer Expression mittels *ML*-Gal4 zeigt sich in den lateralen Faszikeln ein deutlicher Phänotyp. Dieser macht sich in einer bogenförmigen Projektion der Faszikel in einigen Neuromeren bemerkbar (Abb. 6E, Pfeilkopf).

Die ektopische Expression von *If*-RNAi mittels verschiedener Gal4-Treiberlinien führte zu keiner Letalität. Auch eine Expression mittels *da*-Gal4 war lebensfähig.

### 3.1.2. Ektopische Expression von ECM-Proteinen

Neben der Charakterisierung von Verlustmutanten wurde zudem die Auswirkung der ektopischen Expression einiger ECM-Proteine auf die Entwicklung des ZNS untersucht. Dabei standen einige UAS-Konstrukte sowie zahlreiche EP-Linien zur Verfügung (Rorth et al., 1998). Im Anhang findet sich eine komplette Liste der verwendeten EP-Linien und UAS-Konstrukte. Die unterschiedlichen EP- und UAS-





**Abb. 6 Ektopische Expression von *If*-RNAi**

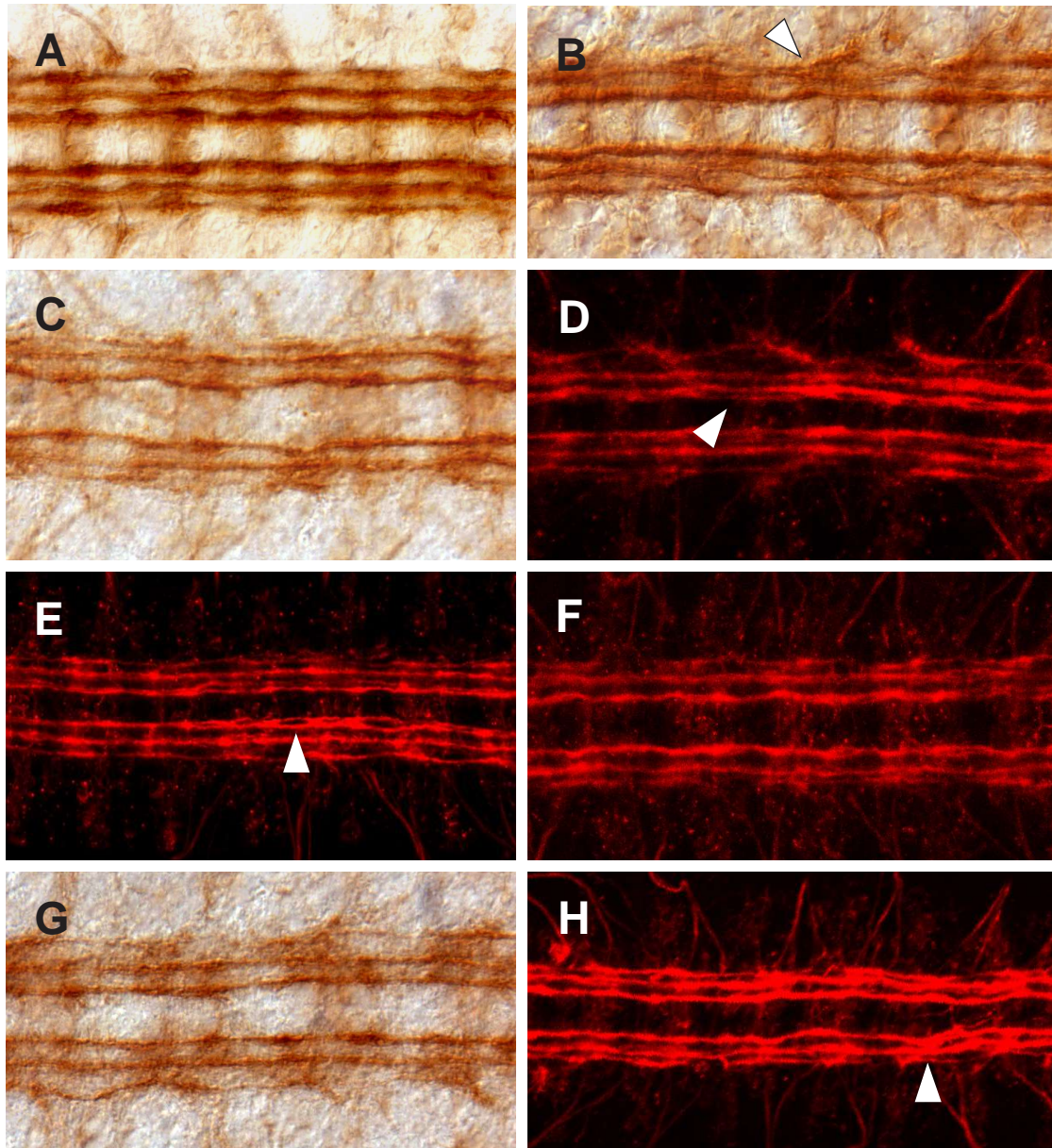
(A/B) *Drosophila* Flügel; (C-E) Präparation des ventralen ZNS im Entwicklungsstadium 16; Antikörperfärbung mit MAb 1D4 (anti-FasII), anterior ist oben. (A/B) Die Expression von *If*-RNAi in der Flügelimaginalscheibe, mittels *ap*-Gal4, resultiert in einer Blasenbildung auf dem adulten Flügel (A, Pfeilkopf). Eine Expression mittels *rho*-Gal4 (D) und *ML*-Gal4 (E) im Embryo führt zu einem Phänotyp im embryonalen ZNS. Im Vergleich zum Wildtyp (C) erscheinen die Axontrakte desorganisiert. (E) Bogenförmige Projektion einiger Axontrakte nach ektopischer Expression mittels *ML*-Gal4 (Pfeilkopf).

Stämme wurden gegen verschiedene Gal4-Stämme gekreuzt. Dabei wurden für eine embryonale ektopische Expression die folgenden Gal4-Treiberlinien verwendet. *btl*-Gal4 (*breathless*), *da*-Gal4 (*daughterless*) und *en*-Gal4 exprimieren vornehmlich in nicht neuronalen Geweben. *breathless* exprimiert in den Tracheen, dem Mitteldarm sowie in den VUM-Neuronen und Mittelliniengliazellen des ZNS. *da*-Gal4 wird ubiquitär in allen Geweben des Embryo exprimiert. Eine Expression von *en*-Gal4 findet sich im Embryo in segmentalen Streifen entlang der dorsoventralen Achse sowie in einigen Neuroblasten. Für eine panneurale Expression im ZNS wurden die Gal4-Linien *elav*-Gal4, *rho*-Gal4 und *sca*-Gal4 verwendet. Dabei exprimiert *elav*-Gal4 in allen postmitotischen Neuronen (*sca*-Gal4 und *rho*-Gal4 Expression s.o). Eine ektopische Expression in der ZNS Mittellinien erlauben die Treiberlinien *sim*-Gal4 und *slit*-Gal4.

Nach erfolgter ektopischer Expression wurden die Embryonen gesammelt und mit unterschiedlichen neuronalen Markern (MAb BP102, anti-FASII und anti-FUTSCH) auf Defekte in der Entwicklung des ZNS hin untersucht.

Alle Kombinationen von EP/UAS-Stämmen und den unterschiedlichen Gal4-Treiberlinien zeigen mit den neuronalen Markern MAb BP102 und anti-FUTSCH keine Defekte in der Entwicklung des ZNS. Lediglich in anti-FASII Färbungen konnten für wenige EP/UAS-Gal4-Kombinationen Defekte in der neuronalen Entwicklung nachgewiesen werden. So findet sich, ähnlich den Ergebnissen der phänotypischen Charakterisierung von Einzelmutanten, nach ektopischer Expression von Integrinen und Proteoglycanen ein ZNS Phänotyp (Abb. 7).

Die ektopische Expression von  $\beta$ PS Integrin (*myospheroid*) in der Mittellinie führt zu einer Desorganisation der longitudinalen Axontrakte. Insbesondere die intermedialen und lateralen Faszikel sind betroffen und verlaufen in untypischen Bahnen. Teilweise lassen sich diese beiden Faszikel nicht mehr deutlich voneinander trennen (Abb. 7B, Pfeilkopf). Auch die Überexpression von  $\alpha$ PS3 Integrin (*scab*) mittels der Gal4-Linien *sim*-Gal4 und *slit*-Gal4 macht sich in einem deutlichen ZNS Phänotyp bemerkbar. Die longitudinalen Faszikel projizieren sehr unregelmäßig, was sich in der Welligkeit der Faszikel sowie im unterschiedlichen Abstand der einzelnen Faszikel zueinander zeigt. Zudem findet sich nach Expression im *sim*-Gal4 Muster eine deutliche Defaszikulation einiger Axontrakte (Abb. 7D, Pfeilkopf). Auch eine ektopische Expression von  $\alpha$ PS2-Integrin (*inflated*) in der Mittellinie resultiert in einer Defaszikulation der longitudinalen Faszikel (Abb. 7E, Pfeilkopf). Die Expression des Integrins  $\beta$ nuPS führt im Vergleich zu den anderen Integrinen zu einem schwächeren



**Abb. 7 Defekte in der Organisation des ZNS nach ectopischer Expression von ECM-Molekülen**

Präparation des ventralen ZNS im Entwicklungsstadium 16; Antikörperfärbung mit anti-FasII; anterior ist links; (A) ZNS im Wildtyp. (B-H) Präparation des ZNS nach ectopischer Expression von ECM-Molekülen. Ectopische Expression von: (B) *mysospheroid* (EP439) mittels *slit*-Gal4, *scab* (EP 2581) mittels (C) *slit*-Gal4 und (D) *sim*-Gal4, (E) *inflated* (UAS-*inf<sup>CG</sup>*) mittels *sim*-Gal4, (F) *βnu-Integrin* (EP2235) mittels *slit*-Gal4, (G) UAS-*dally* mittels *sim*-Gal4 und (H) *syndecan* (EP 2641) mittels *sim* Gal4. Beschreibung der Phänotypen siehe Text (Ergebnisse 3.1.2.)

Phänotyp (Abb. 7E/F). Zwar zeigt sich auch hier eine Desorganisation der longitudinalen Axontrakte, diese fällt allerdings wesentlich schwächer aus.

Neben der ektopischen Expression von Integrinen führt auch die Expression einiger Proteoglycane in der Mittellinien zu einem abnormen ZNS Phänotyp. So zeigt sich nach Überexpression von *dally* und *syndecan* ebenfalls eine Desorganisation der longitudinalen Faszikel (Abb. 7G/H). Die ektopische Expression von *dally* führt zu Defekten der lateralen Faszikel. Diese projizieren in untypischen Bahnen und der Abstand zu den intermedialen Faszikeln variiert. Eine Expression von *syndecan* mittels *sim*-Gal4 resultiert in einer Desorganisation aller longitudinalen Axontrakte. Der Abstand zwischen den drei Faszikeln variiert und teilweise ist keine Trennung der einzelnen Faszikel mehr zu erkennen (Abb. 7H, Pfeilkopf).

Die durchgeführten Überexpressionsstudien zeigen, dass lediglich eine ektopische Expression in der ZNS-Mittellinie (*sim*-Gal4 und *slit*-Gal4) zu einem Phänotyp führt. Eine panneurale Expression von ECM-Molekülen im embryonalen ZNS hat hingegen keinen Einfluss auf die neuronale Entwicklung.

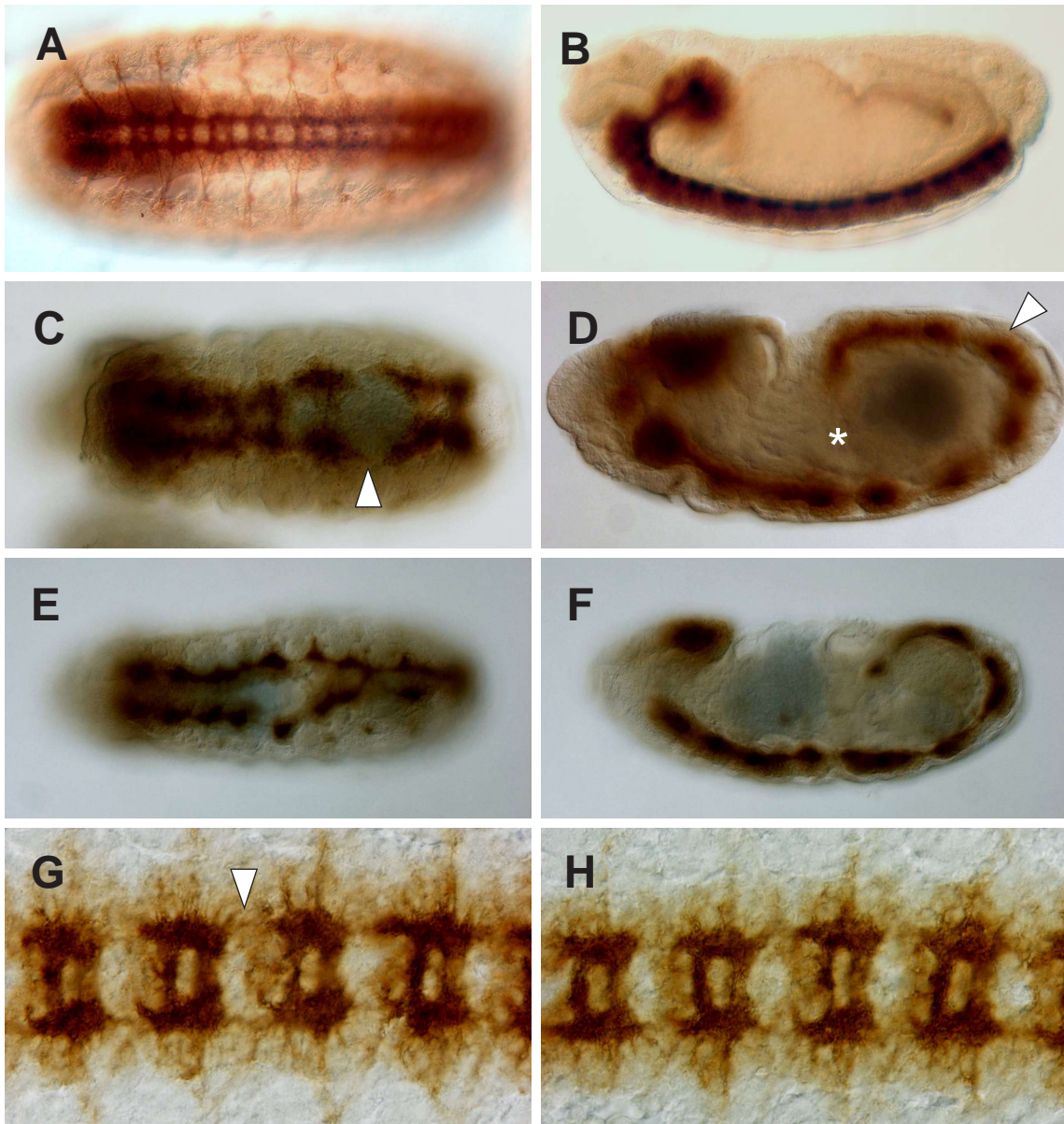
Zur Analyse möglicher adulter Defekte nach ektopischer Expression von ECM-Molekülen, wurden die Nachkommen der EP/UAS-Gal4-Kreuzungen untersucht. Diese Analyse zeigte allerdings keinerlei adulte Defekte. Zusätzlich wurde eine ektopische Expression im adulten Komplexauge mittels der Gal4-Treiberlinien *eyeless*-Gal4 und *GMR*-Gal4 durchgeführt. *eyeless* exprimiert in der kompletten Augenimaginalscheibe. *GMR*-Gal4 erlaubt eine Expression in der Augenimaginalscheibe in allen Zellen posterior der morphogenetischen Furche. Die Analyse der adulten Tiere zeigte, daß die ektopische Expression von ECM-Molekülen im adulten Komplexauge ebenfalls zu keinerlei Defekten führt.

### **3.1.3. Matrix-Metalloproteasen als ECM modifizierende Proteine**

Neben dem direkten Ausfall einiger ECM-Proteine ist es denkbar, dass auch ECM modifizierende Proteine einen Einfluss auf die Entwicklung des ZNS haben. Matrix-Metalloproteasen (MMP's) sind aktiv an der Modellierung der ECM beteiligt (McCawley and Matrisian, 2001; Sternlicht and Werb, 2001). In *Drosophila* sind zwei MMP's bekannt, MMP1 und MMP2, wobei für MMP1 zwei verschiedene Transkripte nachgewiesen wurden (MMP1.f1 und MMP1.f2). Desweiteren wurde in *Drosophila*

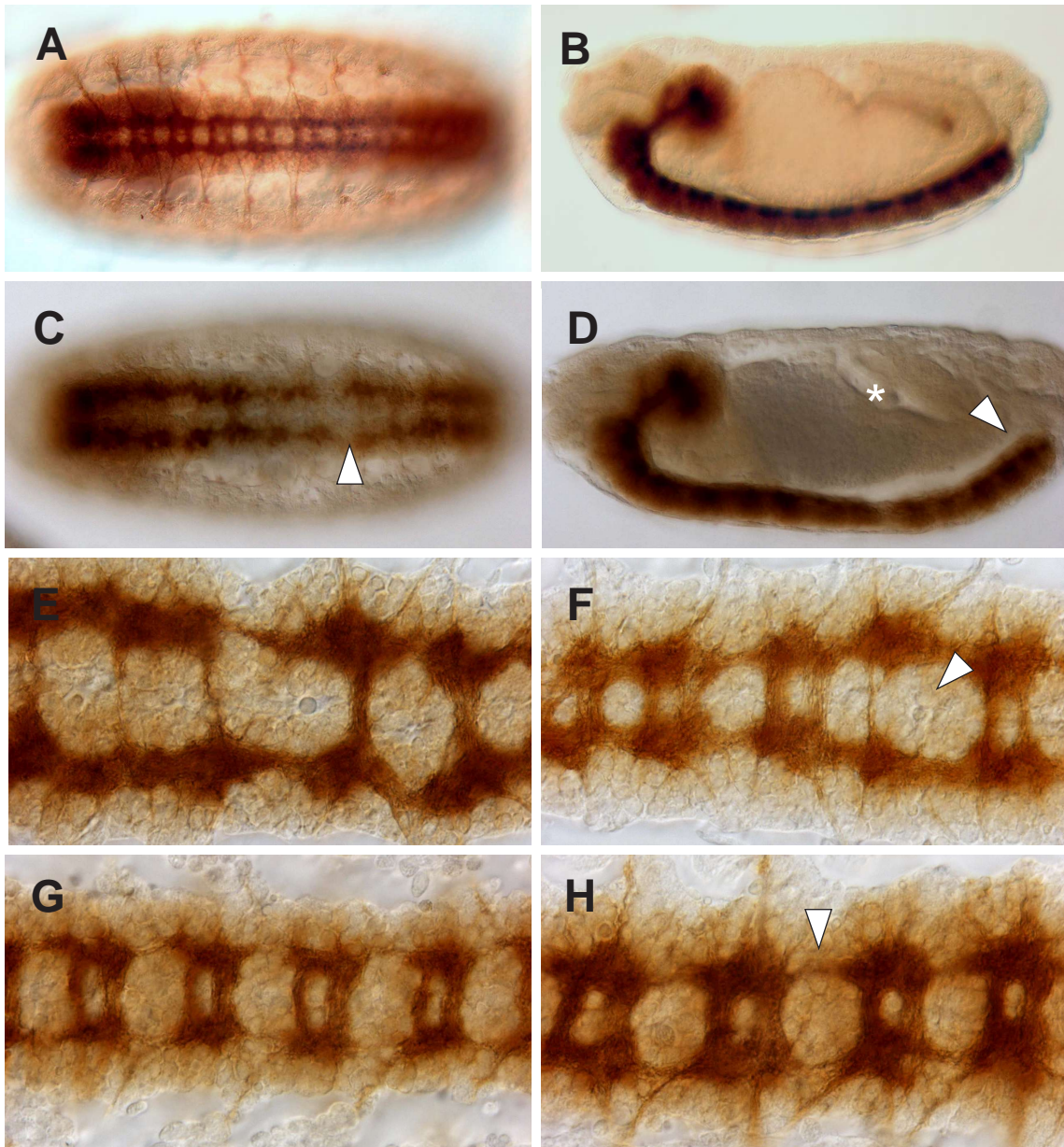
ein Mitglied der TIMP-Familie (Tissue Inhibitor of Metalloproteases) identifiziert, die die Aktivität der MMP's regulieren (Llano et al., 2000; Page-McCaw et al., 2003).

Um die Auswirkungen der MMP's auf die Entwicklung des ZNS zu untersuchen, wurden die verschiedenen MMP's sowie TIMP ektopisch im embryonalen Nervensystem exprimiert. Dabei wurden die Gal4-Treiber *rho*-Gal4, *sca*-Gal4, *sim*-Gal4 und *slit*-Gal4 verwendet. Nach ektopischer Expression wurden die Embryonen gesammelt und mit dem MAb BP102 auf Defekte in der ZNS Entwicklung untersucht. Die ektopische Expression von MMP2 und TIMP führt zu keinerlei Defekten in der Entwicklung des ZNS. Lediglich eine ektopische Expression von MMP1.f1 und MMP1.f2 resultiert in einem Phänotyp. Eine panneurale Expression von MMP1.f1 mittels *rho*-Gal4 und *sca*-Gal4 führt zu massiven Defekten in der Embryogenese. Zum einen ist der Keimstreifrückzug betroffen, der nach ektopischer Expression nahezu vollständig unterbleibt. Auch in späten Entwicklungsstadien ist der Keimstreif noch deutlich gestreckt (Abb. 8D, Pfeilkopf). Zum anderen ist die Darmentwicklung gestört. In der lateralen Ansicht sind die typischen Darmschlingen nicht erkennbar (Abb. 8D, Stern). Zudem sind massive Defekte im ZNS zu beobachten. Die typische Struktur des ZNS geht verloren und es werden weder Kommissuren noch Konnektive ausgebildet. Eine ektopische Expression von MMP1.f1 in der ZNS Mittellinie hingegen resultiert lediglich in einem deutlichen ZNS Phänotyp. Die Entwicklung der Konnektive ist dabei besonders betroffen, da diese in fast allen Neuromeren nicht mehr vorhanden sind (Abb. 8H, Pfeilkopf). Die ektopische Expression von MMP1.f2 führt im Vergleich zu MMP1.f1 zu schwächeren Phänotypen. Nach einer Expression mittels *rho*-Gal4 ist auch hier ein Defekt im Keimstreifrückzug zu erkennen (Abb. 9D, Pfeilkopf), der allerdings deutlich schwächer ausfällt. Auch die Defekte in der Darmentwicklung sind im Vergleich zur ektopischen Expression von MMP1.f1 schwächer. In der Entwicklung des ZNS zeigen sich Defekte die hauptsächlich das kommissurale Wachstum betreffen. Die Kommissuren gehen verloren und die Konnektive werden nur rudimentär ausgebildet. Eine Expression von MMP1.f2 mittels *sca*-Gal4 führt lediglich zu einem ZNS-Phänotyp. Dabei ist vornehmlich das kommissurale Wachstum betroffen. In einigen Neuromeren wird nur eine Kommissur ausgebildet und auch die Konnektive projizieren in untypischen Bahnen (Abb. 9E). Eine ektopische Expression in der ZNS-Mittellinie führt zu Defekten in der Entwicklung der Konnektive. Diese sind deutlich reduziert, wobei im Vergleich zu MMP1.f1 fast in allen Neuromeren ein Rest der Konnektive zu erkennen ist.



**Abb. 8 Defekte in der Organisation des ZNS nach ectopischer Expression von MMP1.f1**

*Whole mount* Präparate und Präparationen des ventralen ZNS; Antikörperfärbung mit MAb BP102; anterior ist links; (B/D/F) ventral ist unten; (A/C/E/G/H) ventrale Ansicht. (A/B) Wildtyp. (C/D) Eine ectopische Expression von MMP1.f1 mittels *rho*-Gal4 resultiert in Defekten im Keimstreifrückzug (D, Pfeilkopf), in der Darmentwicklung (D, Stern) sowie in der ZNS Entwicklung (C, Pfeilkopf). (E/F) Die Expression im *sca*-Gal4 Muster zeigt ähnliche Defekte. (G/H) Eine ectopische Expression in der ZNS Mittellinie mittels *slit*-Gal4 führt zu ZNS Defekten; die Konnektive gehen verloren (G, Pfeilkopf).



**Abb. 9 Defekte in der Organisation des ZNS nach ectopischer Expression von MMP1.f2**

*Whole mount* Präparate und Präparationen des ventralen ZNS; Antikörperfärbung mit MAb BP102; anterior ist links; (B/D) ventral ist unten; (A/C/E-H) ventrale Ansicht. (A/B) Wildtyp. (C/D) Eine ectopische Expression von MMP1.f1 mittels *rho*-Gal4 resultiert in Defekten im Keimstreifrückzug (D, Pfeilkopf), in der Darmentwicklung (D, Stern) sowie in der ZNS Entwicklung (C, Pfeilkopf). (E/F) Die Expression im *sca*-Gal4 Muster zeigt deutliche Defete in der ZNS Entwicklung. Dabei ist hauptsächlich das kommissurale Wachstum betroffen; teilweise kommt es zum Verlust der Kommissuren (F, Pfeilkopf). (G/H) Eine ectopische Expression in der ZNS-Mittellinie mittels *slit*-Gal4 führt zu Defekten in den Konnektiven, die deutlich verringert sind (G, Pfeilkopf).

### **3.2. Untersuchungen zur Funktion des NETRIN-Proteins in der neuronalen Entwicklung von *Drosophila***

Um die Bedeutung einer Sezernierung von NETRIN zu untersuchen, wurde ein modifiziertes, transmembrangebundenes NETRIN Protein generiert. Dieses Konstrukt wurde in eigenen Vorarbeiten erstellt und *in vivo* getestet. In dieser Arbeit wurden die gewonnenen Erkenntnisse verifiziert und eingehend untersucht. Zum einen wurden die Phänotypen nach ektopischer Net-TM Expression im ZNS genauer untersucht, zum anderen sollte ein weiteres modifiziertes Konstrukt generiert werden.

#### **3.2.1. NETRIN in *Drosophila***

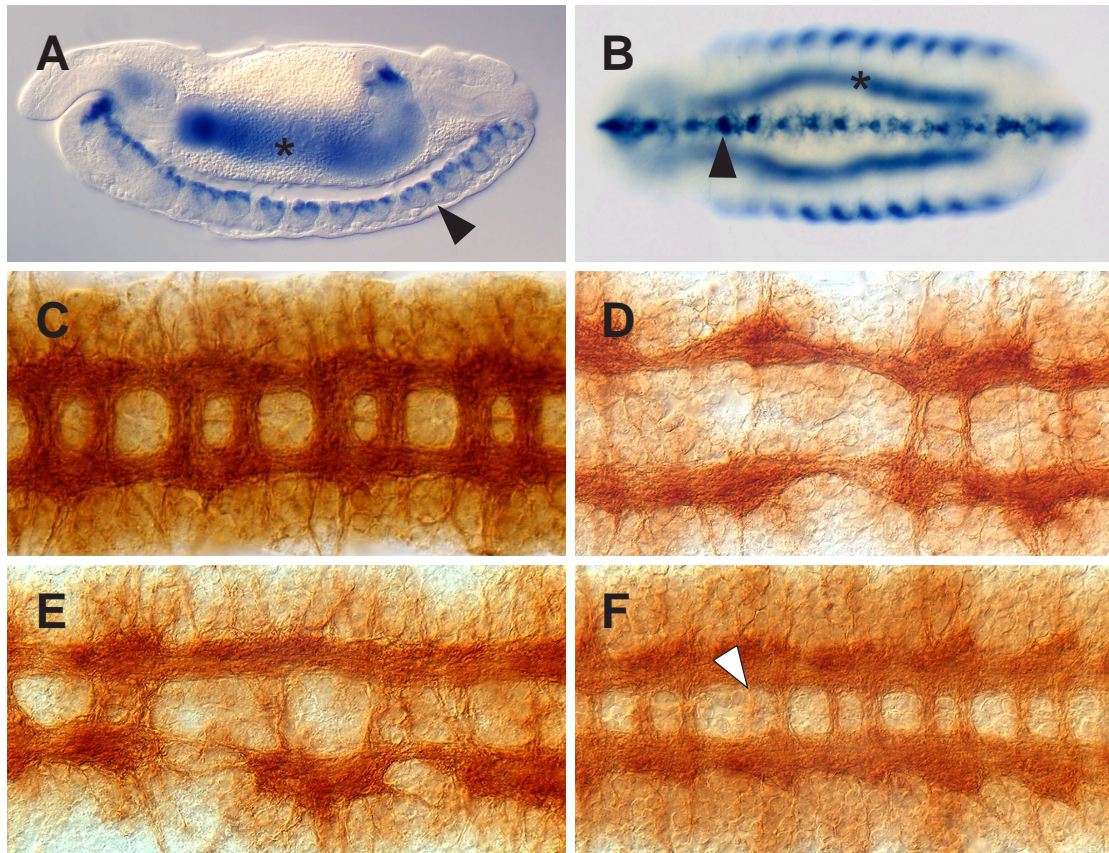
Abb. 10(A/B) zeigt die charakteristische Expression von *Netrin* im *Drosophila* Embryo. Zum einen findet sich eine Expression in Zellen der ZNS Mittellinie (Abb. 10A/B, Pfeilkopf), zum anderen wird *Netrin* im Mesoderm (Abb. 10B; viscerales Mesoderm, Stern) exprimiert. Die Deletion beider NETRINE durch die Defizienzen *Df(1)RK 2* und *Df(1)KA 9* führt zu deutlichen Defekten in der axonalen Organisation des ZNS (Abb. 10D/E). Das kommissurale Wachstum ist dabei am stärksten betroffen. Im embryonalen ZNS kommt es meistens zum Verlust der Kommissuren, allerdings sind vereinzelt noch verdünnte Kommissuren zu erkennen. Die Konnektive sind unterbrochen oder verdünnt und wachsen oftmals in untypischen Bahnen.

Die ektopische Expression von NETRINA führt ebenfalls zu einem ZNS Phänotyp. Dabei führt eine panneurale Expression mittels der Gal4-Treiberlinie *elav-Gal4* zu einer schwachen Phänokopie der Deletionen. In einigen Neuromeren ist deutlich der Verlust, bzw. eine Verdünnung der Kommissuren zu beobachten (Abb. 10F, Pfeilkopf).

#### **3.2.2. NETRINA-TM**

Um die Bedeutung einer Sezernierung von NETRINA zu untersuchen wurde das NETRINA-Protein dahingehend modifiziert, daß am C-Terminus eine Transmembrandomäne eingefügt wurde. Dieses Konstrukt wurde mittels Keimbahntransformation in die Fliege gebracht und mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems ektopisch im ZNS exprimiert. Die eingefügte Transmembrandomäne sollte dabei die





**Abb. 10 Netrin in *Drosophila***

(A/B) *Whole mount in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen; (A) laterale Ansicht, (B) ventrale Ansicht; anterior links. (C-F) Präparation des ventralen ZNS im Stadium 16; Antikörperfärbung mit MAb BP102; anterior links. (A/B) *netrin* Expression im Stadium 13, in der ZNS-Mittellinie (Pfeilkopf) und im visceralen Mesoderm (Stern). (C) ZNS im Wildtyp. (D/E) Defekte in der Organisation des ZNS in den Defizienzen (D) *Df(1)KA-9* und (E) *Df(1)RK-2*. Der Ausfall von *netrinA* und *B* in den Defizienzen führt zum Verlust der Kommissuren. (F) Die ektopische Expression von *NetrinA* im *elav-Gal4*-Muster führt zu einer schwachen Phänokopie des Ausfallphänotyps; einige Kommissuren sind deutlich reduziert (Pfeilkopf).

Sezernierung des modifizierten NETRINA-Proteins unterbinden. So konnte die Bedeutung der Sezernierung des Proteins untersucht werden. In Vorarbeiten wurde ein *netrinA*-TM Konstrukt kloniert und erste ektopische Expressionsstudien wurden durchgeführt.

### 3.2.2.1. Klonierung von *NetrinA*-TM

Ausgehend von der *netrinA*-cDNA wurde mittels molekularbiologischer Methoden eine Transmembrandomäne aus dem *CD2* Gen der Ratte (Dunin-Borkowski and Brown, 1995) in die *netrinA*-cDNA eingefügt. Zunächst wurde die Transmembrandomäne mittels PCR aus dem *CD2* Gen amplifiziert und anschliessend in die *netrinA*-cDNA kloniert. Das erhaltene *netrinA*-TM Konstrukt (NETA-TM) wurde in den pUAST-Vektor kloniert und per Keimbahntransformation in die Fliege gebracht. Nach der Etablierung transgener UAS-NETA-TM Fliegen konnte *in vivo* über das UAS/Gal4-System die Auswirkung des NETA-TM Konstruktes getestet werden.

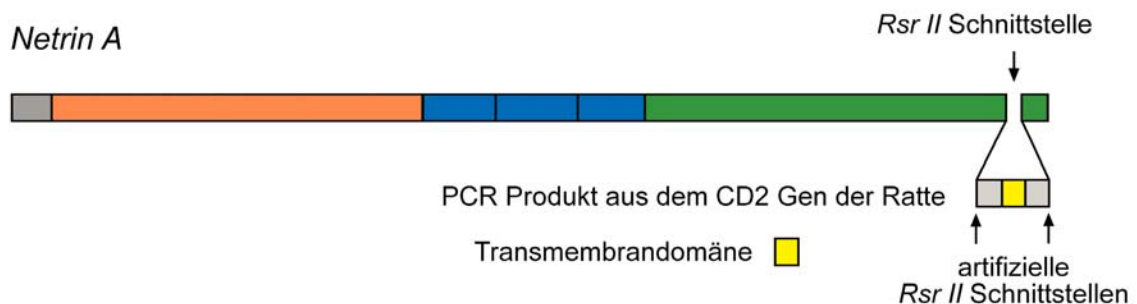
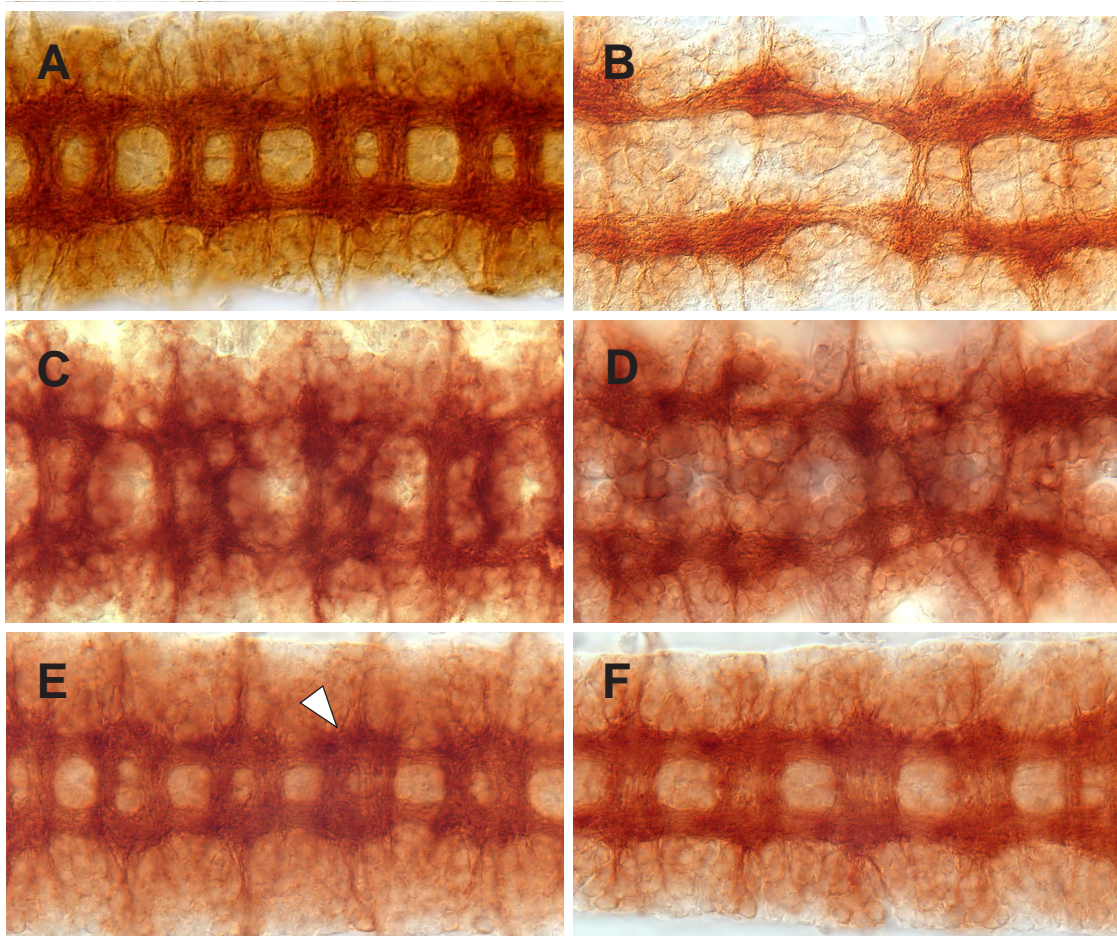


Abb. 11 Schematische Darstellung des klonierten NetrinA-TM-Konstruktes

### 3.2.2.2. Ektopische Expression von NETA-TM

Nach der erfolgreichen Etablierung transgener UAS-NETA-TM Fliegen wurde in Vorarbeiten die Auswirkung einer ektopischen NETA-TM Expression auf das embryonale ZNS untersucht. Zunächst wurde getestet, ob eine ektopische NETA-TM Expression den Phänotyp der *netrin*-Defizienz *Df(1)KA 9* retten kann. Die ektopische Expression von NETRINA mittels *rho*-Gal4, im Hintergrund der Defizienz *Df(1)KA 9*, führt zu einer partiellen Rettung des Ausfallphänotyps (Abb. 12C). Im Gegensatz zur Rettung mit UAS-NETRINA zeigt die ektopische Expression von NETA-TM mittels *rho*-Gal4, im Hintergrund von *Df(1)KA 9*, keine Rettung des Phänotyps (Abb. 12D).



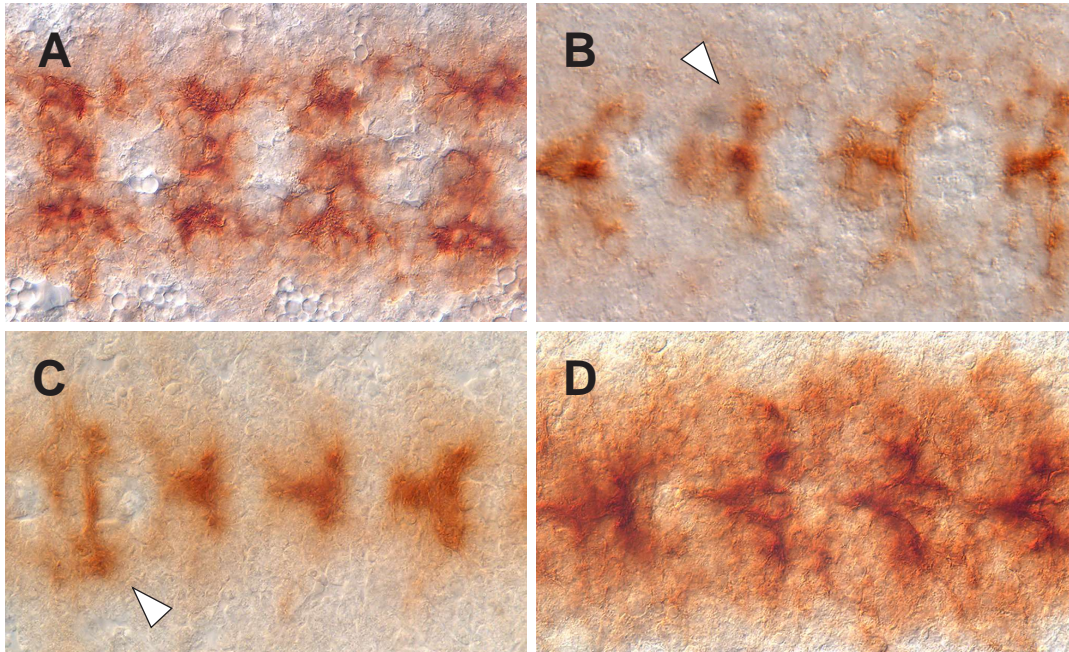
**Abb. 12 Ektopische Expression von NetA-TM im *Drosophila* Embryo**  
 Präparation des ventralen ZNS im Stadium 16; Antikörperfärbung mit MAb BP102; anterior ist links. (A) ZNS im Wildtyp; (B) Defekte in der Organisation des ZNS in der Defizienz *Df(1)KA-9*. (C) Rettung des ZNS Phänotyps von *Df(1)KA-9* durch ektopische Expression von NetrinA mittels *rho*-Gal4. (D) Durch eine Expression von NetrinA-TM im *rho*-Gal4-Muster kann der Phänotyp nicht gerettet werden. Die ektopische Expression von NetA-TM in der ZNS-Mittellinie im wildtypischen Embryo mittels (E) *ML*-Gal4 und (F) *slit*-Gal4 führt zu einem ZNS Phänotyp; der interkommissurale Raum ist verringert und teilweise ist eine Fusion der Kommissuren zu beobachten (E, Pfeilkopf).

Anschließend wurden Überexpressionsstudien von UAS-NETA-TM mittels verschiedener neuronaler Gal4-Treiberlinien durchgeführt. Dabei kamen die Gal4-Linien *elav-Gal4*, *ML-Gal4*, *rho-Gal4*, *sca-Gal4*, *sim-Gal4* und *slit-Gal4* zum Einsatz. Eine ektopische Expression von NETA-TM in der Mittellinie mittels *ML-Gal4*, *sim-Gal4* und *slit-Gal4* führt dabei zu Defekten in der Entwicklung des ZNS. Färbungen mit MAb BP102 zeigen diese Defekte im ZNS (Abb. 12 E/F). Die Kommissuren sind verdickt, der interkommissurale Raum ist deutlich verringert und in einigen Neuromeren ist eine Fusion der Kommissuren zu beobachten (Abb. 12E, Pfeilkopf); zudem sind die Konnektive teilweise verdünnt.

Weiterführende Analysen der ZNS Phänotypen nach ektopischer NETA-TM Expression ergaben, dass bereits die frühe Entwicklungsphase des ZNS betroffen ist. So findet sich, sowohl nach einer Expression in der Mittellinie (*ML-Gal4*, *sim-Gal4* und *slit-Gal4*), als auch nach einer panneuralen Expression (*rho-Gal4*), schon im Stadium 10 ein Defekt im embryonalen ZNS (Abb. 13). Dabei akkumulieren die BP102 positiven Axone an der ZNS-Mittellinie und in den lateralen Bereichen des ZNS sind im Vergleich zum Wildtyp kaum Axone erkennbar (Abb. 13B, Pfeilkopf). Dieser Phänotyp macht sich allerdings nicht in allen Neuromeren bemerkbar. Einige Neuromere zeigen weiterhin ein wildtypisches Axonmuster (Abb. 13C, Pfeilkopf).

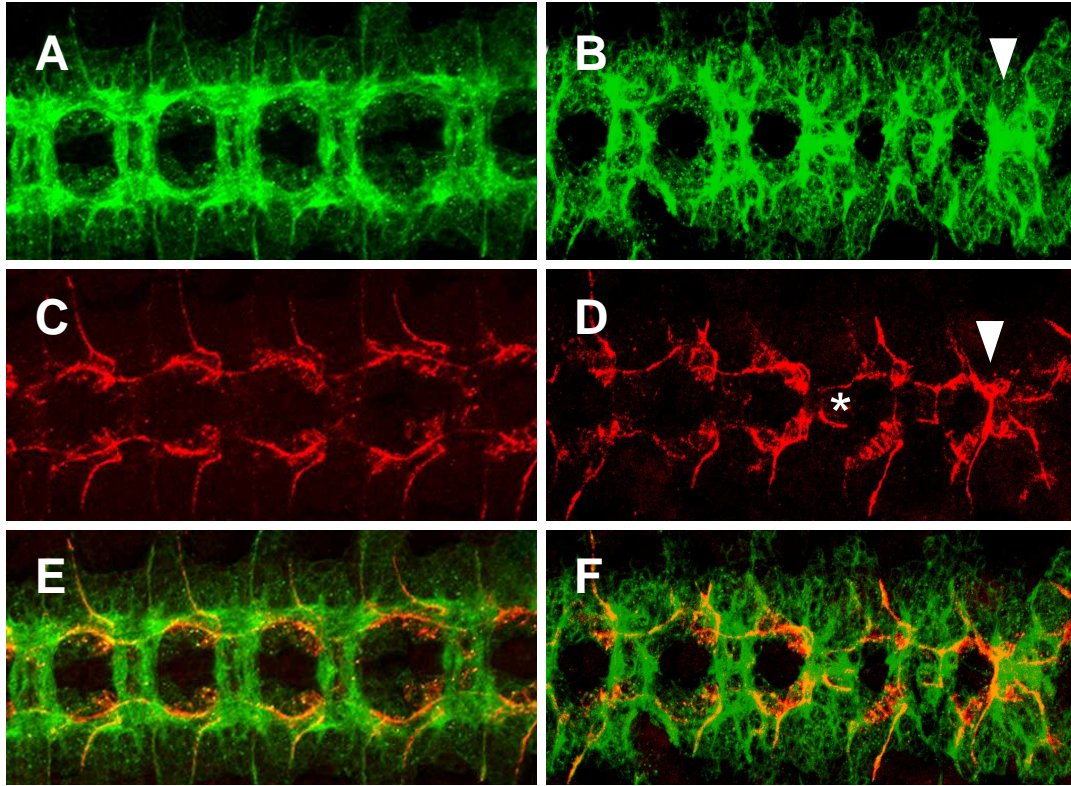
Neben der Analyse der Phänotypen durch Antikörperfärbungen mit MAb BP102 wurden zudem konfokale Analysen mit den Antikörpern anti-HRP und anti-FASII durchgeführt. Abb. 14 zeigt die Defekte in der frühen ZNS Entwicklung nach ektopischer NETA-TM Expression mittels *ML-Gal4*. Im Stadium 12 zeigt sich in anti-HRP Färbungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 14A) eine Verschiebung der Axone zur Mittellinie (Abb. 14B). In einigen Neuromeren ist eine deutliche Akkumulation von Axonen an der Mittellinie zu erkennen (Abb. 14B, Pfeilkopf). In anti-FASII Färbungen im gleichen Embryo ist eine Verschiebung zur Mittellinie auch für longitudinale Axontrakte zu beobachten. Die Faszikel liegen im Vergleich zur wildtypischen Situation deutlich näher an der Mittellinie (Abb. 14D, Stern). Zudem wachsen einige longitudinale Axone auf die Mittellinie zu, bzw. kreuzen diese (Abb. 14D, Pfeilkopf). Eine konfokale Analyse der ektopischen Expression von NETA-TM mittels *sim-Gal4* und *slit-Gal4* zeigt die gleichen frühen Phänotypen in anti-HRP und anti-FASII Färbungen (nicht gezeigt).

Embryonen in späteren Entwicklungsstadien zeigen in den konfokalen Analysen lediglich einen ZNS-Defekt in anti-HRP Färbungen. Diese entsprachen den mit MAb



**Abb. 13 Ektopische Expression von NetA-TM**

Präparation des ventralen ZNS im Stadium 10; Antikörperfärbung mit MAb BP102; anterior ist links; (A) ZNS im Wildtyp. Eine Ektopische Expression von NetA-TM mittels (B) *ML-Gal4*, (C) *sim-Gal4* und (D) *rho-Gal4* führt zu einem Phänotyp in der frühen Entwicklung des ZNS. Die ZNS-Axone akkumulieren an der Mittellinie; im Vergleich zum Wildtyp sind in lateralen Bereichen kaum Axone zu erkennen (B, Pfeilkopf). Teilweise weisen die Neuromere ein wildtypisches Axonmuster auf (C, Pfeilkopf).



**Abb. 14 Ektopische Expression von NetA-TM; konfokale Analyse**  
 Konfokale Analysen am *whole mount*; anterior ist links; ventrale Ansicht; Fokussierung auf das embryonale ZNS. (A/C/E) Wildtyp; Antikörperfärbungen mit anti-HRP (grün) und anti-FasII (rot); (E/F) Überlagerung der Signale (gelb). (B/D/F) Die ektopische Expression von NetA-TM in der ZNS-Mittellinie mittels *ML-Gal4* führt zu Defekten im ZNS. (B) Akkumulation von Axonen an der ZNS-Mittellinie (Pfeilkopf). (D) In anti-FasII Färbungen ist zu erkennen, daß einige Axone im Vergleich zum Wildtyp in Richtung ZNS-Mittellinie projizieren (Pfeilkopf); zudem liegen die Faszikel näher zur Mittellinie (Stern).

BP102 analysierten Phänotypen (s.o.). In anti-FASII Färbungen war hingegen kein Defekt erkennbar (nicht gezeigt).

### 3.2.2.2.1. Auszählung der Defekte nach ektopischer NETA-TM Expression

Nach ektopischer Expression von NETA-TM mittels *ML-Gal4*, *sim-Gal4* und *slit-Gal4* wurden die Embryonen gesammelt und mit MAb BP102 gefärbt. Um die beobachteten ZNS-Defekte mit der ektopischen NETA-TM Expression zu korrelieren, wurden die Färbungen anschließend ausgezählt. Hierzu wurden die Embryonen in drei verschiedene Entwicklungsstadien eingeteilt und anschließend die Embryonen gezählt, die einen ZNS-Defekt aufweisen, bzw. ein wildtypisches ZNS-Muster zeigen. Abb. 15 zeigt die vorgenommene Einteilung in die unterschiedlichen Entwicklungsstadien, sowie exemplarisch für die jeweiligen Stadien einen Embryo mit einem typischen ZNS-Defekt und einen wildtypischen Embryo.

In den Tabellen 2-4 sind die Ergebnisse der Auszählungen aufgeführt.

Tabelle 2: Defekte nach ektopischer NETA-TM Expression mittels *ML-Gal4*

UAS-NETA-TM / <i>Cyo</i> ; +/+ X +/+ ; <i>ML-Gal4/ML-Gal4</i>			
Stadium	wildtypische Embryonen	Embryonen mit ZNS Defekten	Verhältnis: Defekt / Wildtyp
10-12	51	26	34 %
13/14	136	66	33 %
15/16	163	91	36 %
Summe	350	183	34 %

Tabelle 3: Defekte nach ektopischer NETA-TM Expression mittels *sim-Gal4*

UAS-NETA-TM / <i>Cyo</i> X <i>sim-Gal4/sim-Gal4</i>			
Stadium	wildtypische Embryonen	Embryonen mit ZNS Defekten	Verhältnis: Defekt / Wildtyp
10-12	30	14	32 %
13/14	301	74	20 %
15/16	128	38	23 %
Summe	459	126	22 %

Tabelle 4: Defekte nach ektopischer NETA-TM Expression mittels *slit*-Gal4

UAS-NETA-TM / <i>Cyo X slit</i> -Gal4/ <i>slit</i> -Gal4			
Stadium	wildtypische Embryonen	Embryonen mit ZNS Defekten	Verhältnis: Defekt / Wildtyp
10-12	58	41	41 %
13/14	256	111	30 %
15/16	72	39	35 %
Summe	386	191	33 %

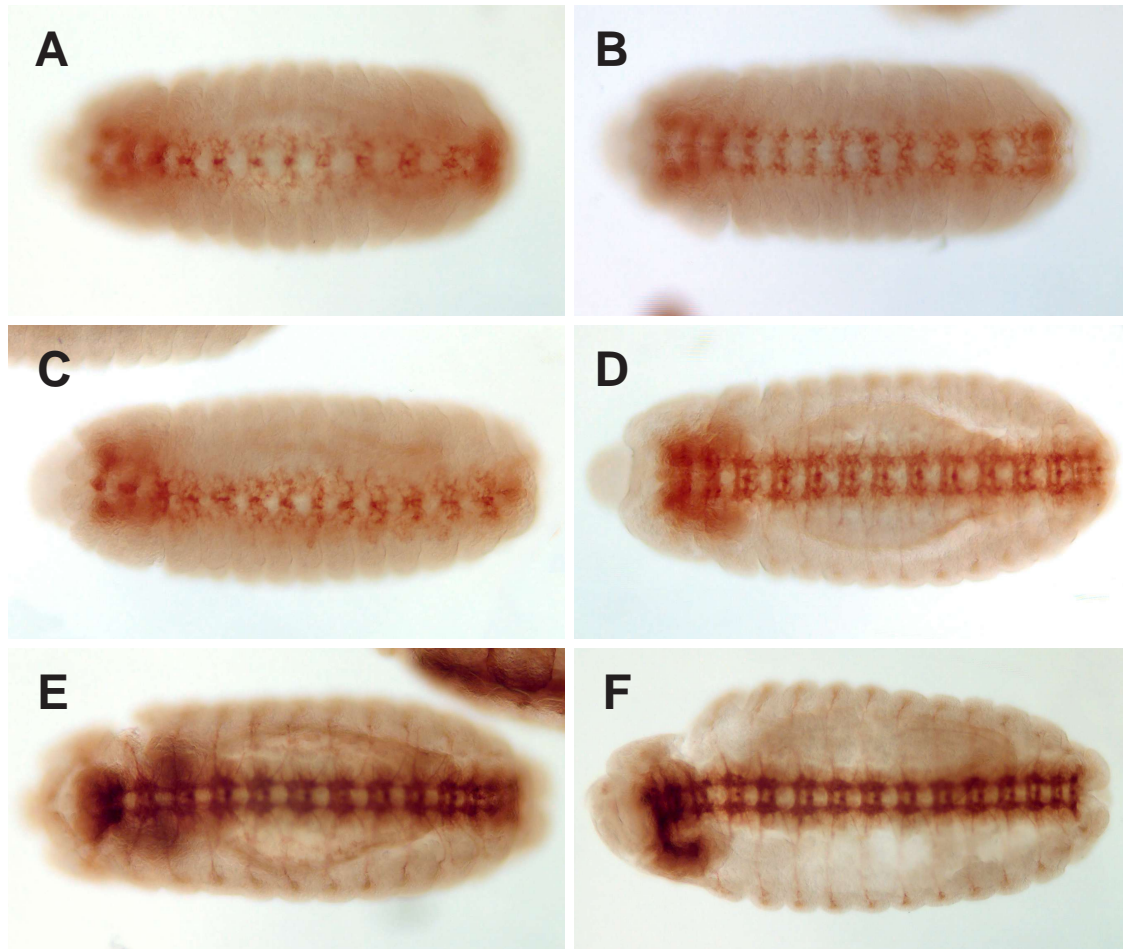
Die Auszählungen zeigen, daß nach ektopischer Expression von NETA-TM gehäuft Defekte im embryonalen ZNS zu erkennen sind. Allerdings ist der beobachtete Phänotyp nicht so penetrant wie erwartet, da in der Hälfte aller Embryonen ein Phänotyp im ZNS erwartet wurde. Zudem zeigen die Auszählungen, daß die ektopische Expression mittels *sim*-Gal4 im Vergleich zu *ML*-Gal4 und *slit*-Gal4 einen schwächeren Einfluss auf die ZNS Entwicklung hat.

### 3.2.3. Klonierung eines Epitop-markierten NETA-TM Protein

Um die Auswirkung der ektopischen Expression von NETA-TM besser bewerten zu können, ist es erforderlich die Expression des Konstruktes sichtbar zu machen. Leider steht für NETRINA kein Antikörper zur Verfügung. Daher wurde ein NETRINA-TM Konstrukt kloniert, das am N-Terminus und am C-Terminus ein Protein-Tag trägt. Dafür wurde N-terminal ein FLAG-Tag und C-terminal ein MYC-Tag in die *NetrinA-TM* DNA eingefügt.

Nach Restriktionskontrolle und Sequenzierung wurde das klonierte NETA-TM-Tag Konstrukt per Keimbahntransformation in die Fliege gebracht. Nach der Etablierung transgener NetA-TM-Tag Fliegen wurden diese auf eine Expression des Konstruktes getestet. Jedoch konnte nach ektopischer Expression des NetA-TM-Tag Konstruktes mittels verschiedener Gal4 Treiberlinien keine Expression der Proteintags nachgewiesen werden. Weder eine FLAG noch eine MYC Expression waren zu detektieren. Anschliessende genaue Sequenzierungen des Konstruktes und eingehende Restriktionskontrollen bestätigten die korrekte Klonierung des Konstruktes. Somit konnte der Grund der fehlenden Funktionalität des Konstruktes nicht geklärt werden. Weitere Analysen um dies zu klären stehen noch aus.





**Abb. 15 Ektopische Expression von NetA-TM**

*Whole mount* Präparate; Antikörperfärbung mit MAb BP102; anterior ist links; ventrale Ansicht. (A/C/E) Defekte in der Organisation des ZNS nach ektopischer Expression von NetA-TM mittels *ML-Gal4*. (B/D/F) Embryonen mit wildtypischem ZNS. (A/B) Stadium 11/12; (C/D) Stadium 13/14; (E/F) Stadium 15/16. Einteilung der Embryonen in verschiedene Stadien zur Auszählung der Verteilung der beobachteten Defekte im ZNS.

### 3.3. Untersuchungen zur Funktion des SLIT-Proteins in der neuronalen Entwicklung von *Drosophila*

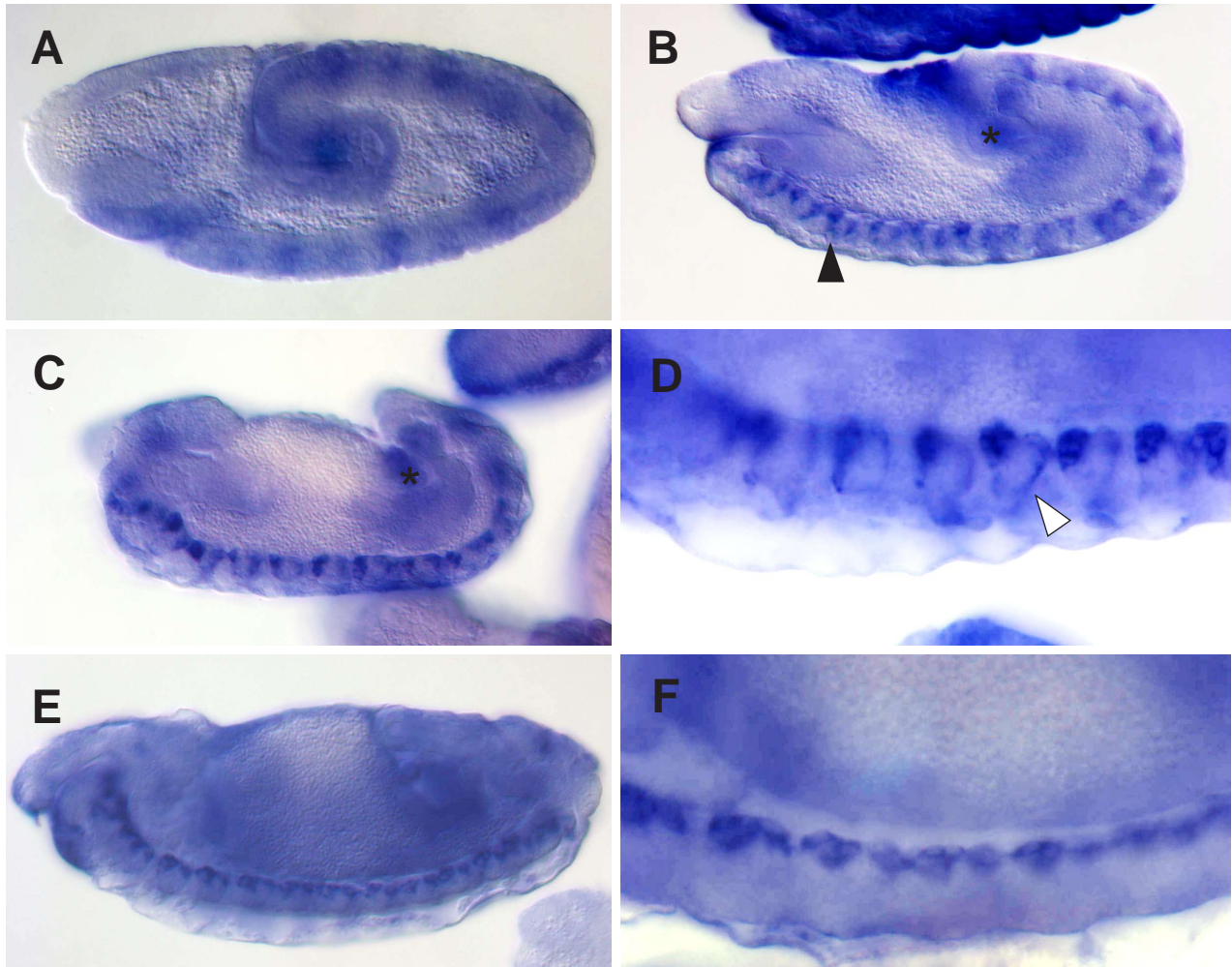
Um die Funktion und die Lokalisation des SLIT-Proteins genauer zu analysieren, wurden verschiedene UAS-*slit*-Konstrukte kloniert. Diese wurden mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems sowohl in Zellkultur als auch in der Fliege ektopisch exprimiert. So war es möglich, den postulierten SLIT-Gradienten zu untersuchen sowie die genauere Funktion des SLIT-Signals in der Entwicklung des embryonalen ZNS von *Drosophila* zu analysieren. Einerseits wurde SLIT mit einem MYC-Tag versehen, um die Sezernierung und Verteilung *in vivo* und *in vitro* zu verfolgen. Andererseits wurde ein *slit*-Konstrukt generiert, in dem die Einfügung einer Transmembrandomäne die Sezernierung unterbindet.

#### 3.3.1. SLIT-Expression

Die Untersuchung der wildtypischen embryonalen Expression von SLIT erfolgte auf der RNA- und auf der Protein-Ebene. So wurden sowohl *whole mount RNA in situ* Hybridisierungen als auch anti-SLIT Antikörperfärbungen an wildtypischen Embryonen durchgeführt.

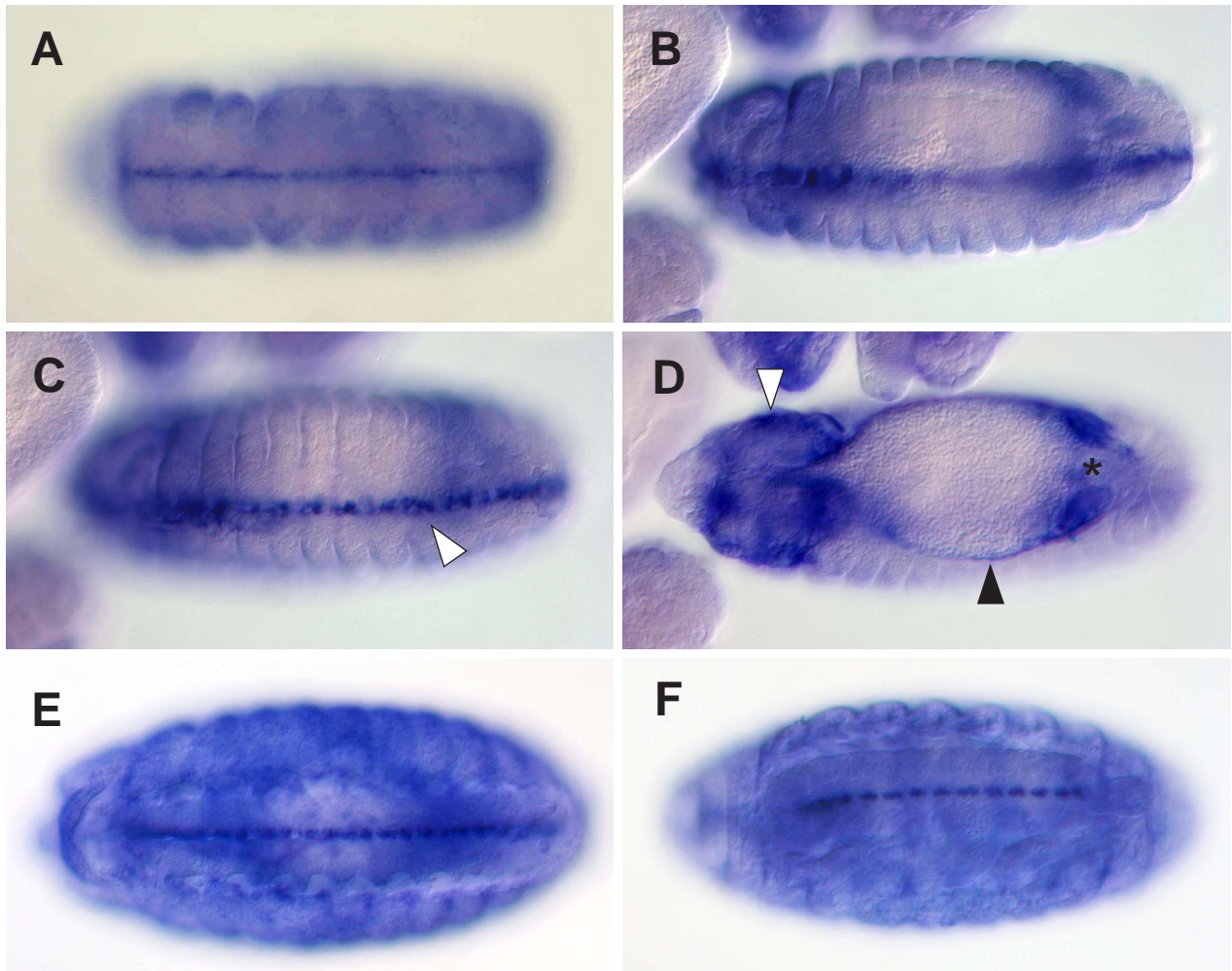
Ab Stadium 10, nach erfolgter Keimstreifverlängerung, findet sich eine Expression in Zellen des Mesektoderms (Abb. 16A). In der weiteren Entwicklung, ab Stadium 12, beschränkt sich die *slit*-RNA-Expression im Nervensystem auf die Mittelliniengliazellen (Abb. 16B; 17C, Pfeilkopf). In frühen Stadien weisen die Mittelliniengliazellen lange dorsale Ausläufer auf (Abb. 16D, Pfeilkopf). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung wandern die Mittelliniengliazellen in die Ebene der Axone des ZNS (Abb. 16E). Neben der Expression im Nervensystem findet sich zudem eine Expression in verschiedensten anderen Geweben. In Abb. 17B-D ist derselbe Embryo in verschiedenen Fokusebenen dargestellt. Neben der Expression in den Mittelliniengliazellen ist hier zudem eine Expression im Kopfmesoderm (Abb. 17D, weißer Pfeilkopf), im Hinterdarm (Abb. 17D, Stern) sowie in Zellen der Amnioserosa (Abb. 17D, schwarzer Pfeilkopf) zu finden.

Zur Analyse der embryonalen Expression des SLIT-Proteins wurden wildtypische Embryonen mit dem anti-SLIT-Antikörper MAb C555.6d gefärbt. Die erste erkennbare Expression des Proteins findet sich im Stadium 13 und beschränkt sich auf die



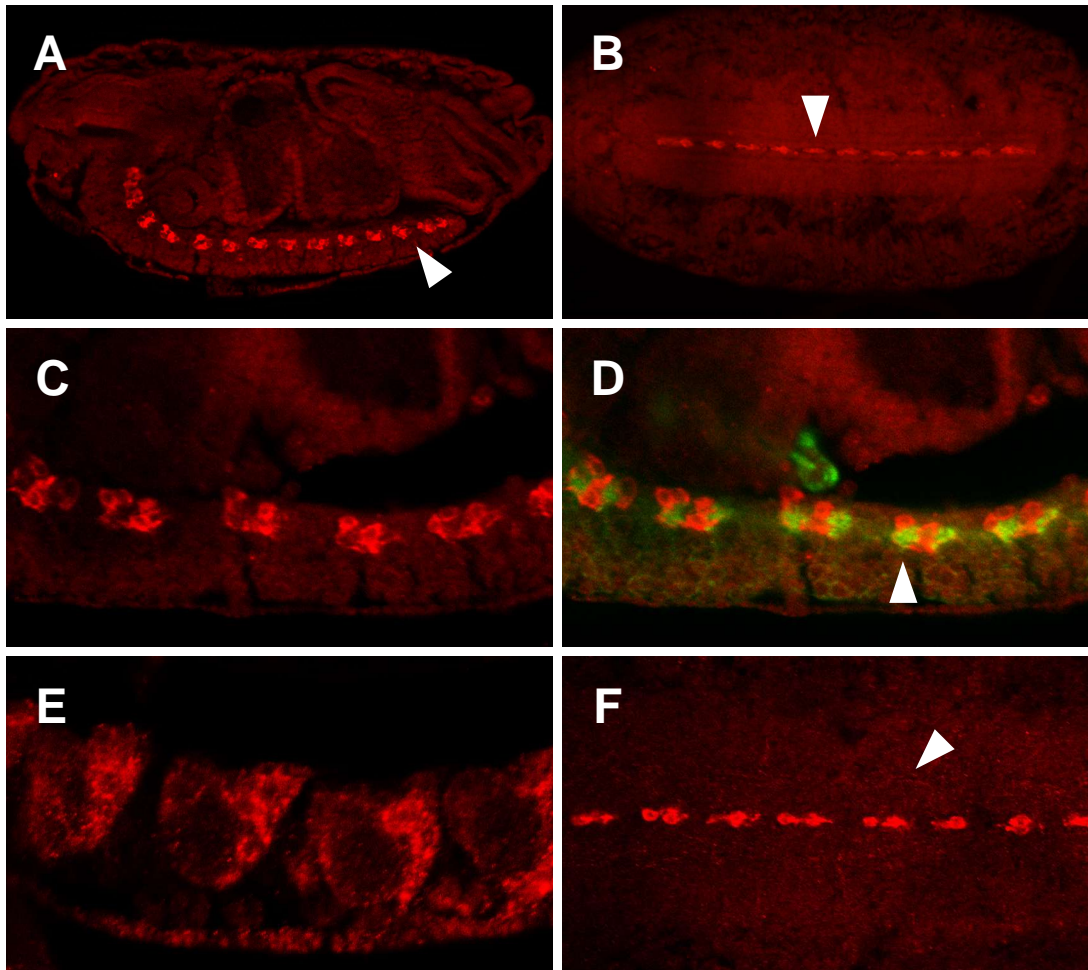
**Abb. 16 Embryonale RNA-Expression von *slit*.**

*Whole mount in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen; laterale Ansicht; anterior ist links; ventral ist unten. (A) RNA-Expression von *slit* im Stadium 11; Expression in Zellen des Mesektoderms. (B-F) Ab Stadium 12 (B) beschränkt sich die Expression im ZNS auf die Mittelliniengliazellen (Pfeilkopf); (D) Vergrößerung der ZNS-Expressionsdomäne von *slit* im Stadium 13; es sind die dorsalen Ausläufer der Mittelliniengliazellen zu erkennen (Pfeilkopf). (F) zeigt die Mittelliniengliazellen im Stadium 15. Neben der ZNS-Expression findet sich eine weitere *slit*-Expression im Primordium des Hinterdarm (B/C, Stern). (E) *slit*-Expression im Stadium 14.



**Abb. 17 Embryonale RNA-Expression von *slit*.**

*Whole mount in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen; ventrale Ansicht; anterior ist links. (A) RNA Expression von *slit* im Stadium 11; Expression in Zellen des Mesektoderms. Ab Stadium 12/13 (B) beschränkt sich die Expression im ZNS auf die Mittelliniengliazellen (Pfeilkopf); (B-D) Dynamische Expression von *slit* im Stadium 13; neben der Expression in den Mittelliniengliazellen findet sich zudem eine Expression im Kopfmesoderm (D, Pfeilkopf weiß), in Zellen der Amnioserosa (D, Pfeilkopf schwarz) und im Primordium des Hinterdarm (D, Stern). *slit*-Expression in der ZNS-Mittellinie in Stadium 15 (E) und Stadium 16 (F).



**Abb. 18 Embryonale Expression des Slit-Proteins**

Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; Antikörperfärbung mit anti-Slit (MAb c555.6d); (A/C/D/E) laterale Ansicht, ventral ist unten; (B/F) ventrale Ansicht; anterior ist links. (A/B) Slit Expression in den Mittelliniengliazellen im Stadium 16 (Pfeilkopf). (C/D) Fokussierung in lateraler Ansicht auf das ventrale ZNS; eine zusätzliche Färbung mit anti-HRP (grün) visualisiert die Axone des ZNS und zeigt die Umhüllung der Kommissuren durch die Mittelliniengliazellen (Pfeilkopf). (E) Slit-Expression im Stadium 13; Vergrößerung des ventralen ZNS. (F) Schwache Slit-Expression auf longitudinalen Axonen in ventraler Ansicht (Pfeilkopf).

Mittelliniengliazellen (Abb. 18E). Auch in späteren Stadien ist eine deutliche Expression lediglich in den Mittelliniengliazellen erkennbar (Abb. 18A/B). Abb. 18C/D zeigt die typische Morphologie der Mittelliniengliazellen. In einer Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker anti-HRP ist zu erkennen, wie die Mittelliniengliazellen die Kommissuren umhüllen (Abb. 18D, Pfeilkopf). Eine genaue konfokale Analyse der SLIT-Verteilung im embryonalen ZNS zeigt neben der Expression in Mittelliniengliazellen eine zusätzliche, schwache Expression auf longitudinalen Axonen (Abb. 18F, Pfeilkopf).

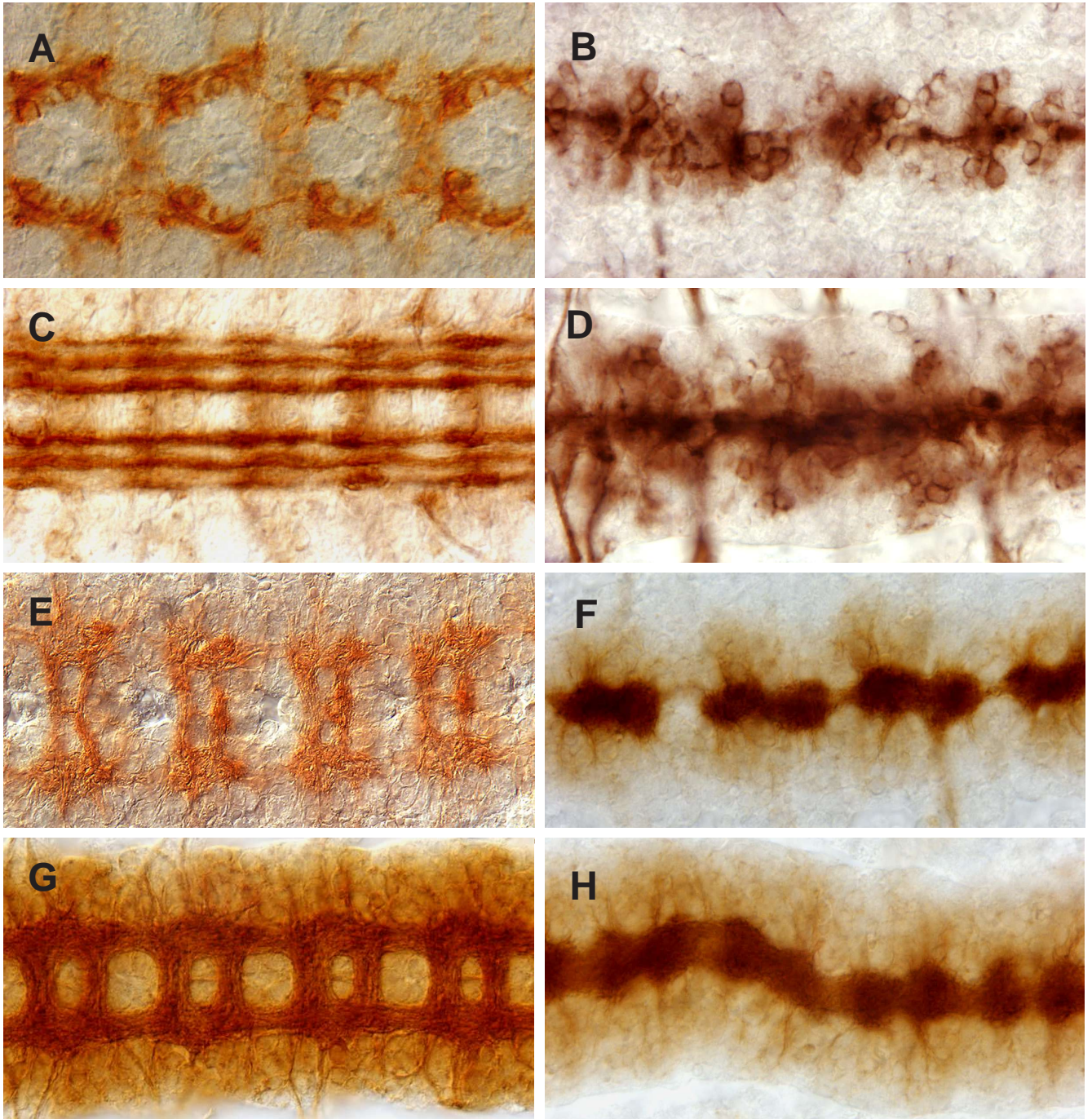
### 3.3.2. Phänotypische Charakterisierung der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup>

Der *slit*-Lokus befindet sich auf dem zweiten Chromosom bei 52C9-D1. Für diesen Locus wurden verschiedene mutante Allele veröffentlicht, die zum kompletten Verlust der *slit*-Genfunktion führen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> verwendet (Schimmelpfeng et al., 2001).

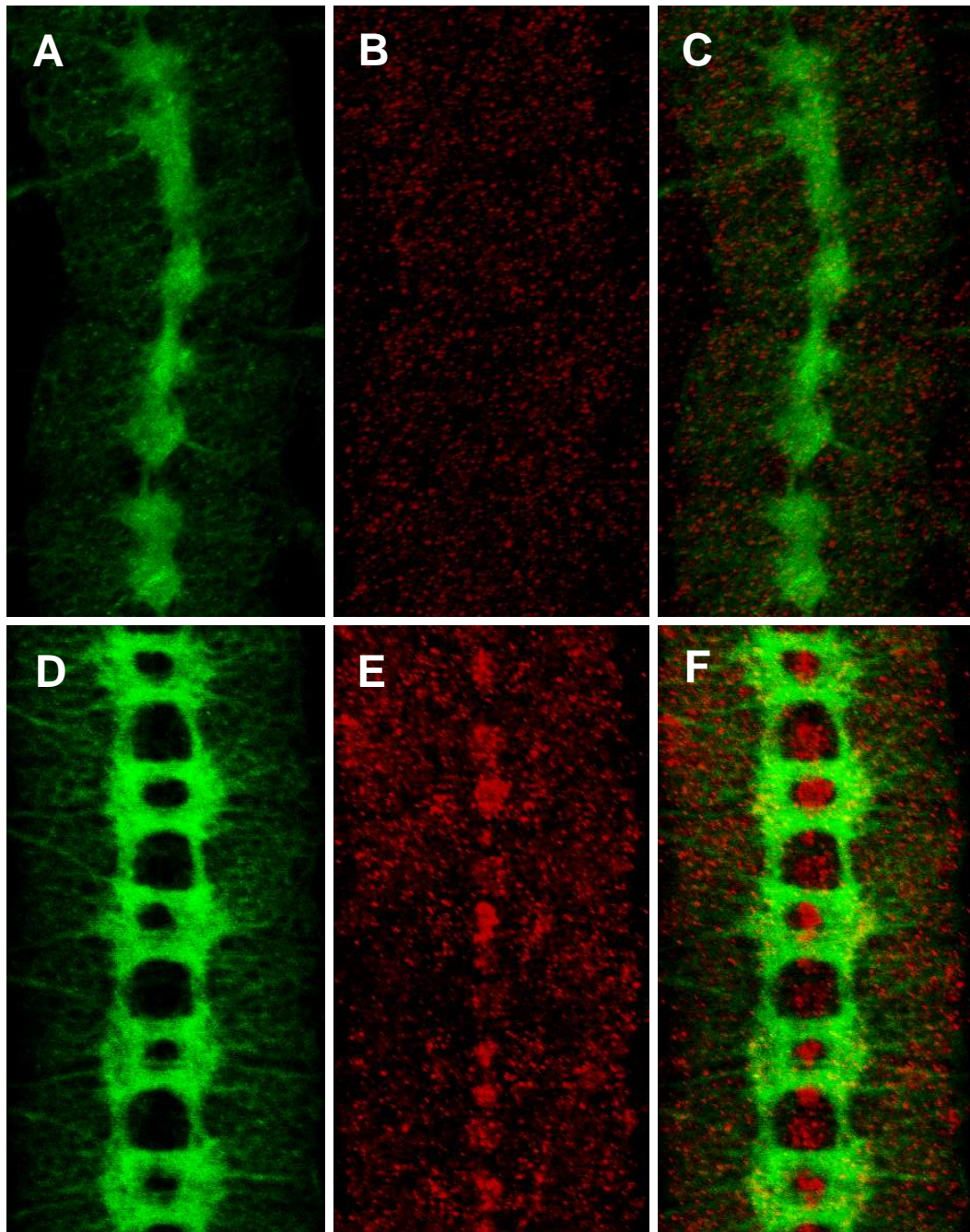
Um die Auswirkungen des Verlustes der Genfunktion auf die Entwicklung des ZNS zu untersuchen, wurde der Phänotyp der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> charakterisiert. Hierzu wurden *slit*<sup>B1-32</sup> mutante Embryonen mit zwei verschiedenen neuronalen Markern gefärbt. Dabei wurden die monoklonalen Antikörper BP102 und anti-FASII verwendet. Nach erfolgter Antikörperfärbung wurde das ZNS homozygot mutanter Embryonen analysiert. Dabei werden homozygot mutante Embryonen durch den Gebrauch von "blauen Balancern" identifiziert.

Der Ausfall der *slit*-Genfunktion führt zu massiven Defekten in der Entwicklung des ZNS von *Drosophila*. Dabei ist sowohl in MAb BP102 (Abb. 19B/D) als auch in anti-FASII Färbungen (Abb. 19F/H) schon in frühen Entwicklungsstadien (Abb. 19B/F) ein Kollaps der Axone an der ZNS-Mittellinie zu beobachten. Im Vergleich zur wildtypischen Situation (Abb. 19A/E) findet sich keine regelmässige Struktur des ZNS. Alle Axone wachsen zur Mittellinie und können diese nicht mehr verlassen. Dieser Phänotyp verändert sich auch im Laufe der ZNS-Entwicklung nicht. So ist zum Ende der Embryonalentwicklung anstatt des regelmäßigen Strickleitermusters ein einziges dickes Axonbündel in der Mittellinie des Embryo zu finden (Abb. 19D/H).

Neben der Analyse des mutanten ZNS-Phänotyps von *slit*<sup>B1-32</sup> wurde in Doppelfärbungen untersucht, inwieweit der Genverlust auch zum Verlust des Proteins führt. Homozygot mutante *slit*<sup>B1-32</sup> Embryonen wurden mit anti-SLIT sowie



**Abb. 19 Defekte in der Organisation des ZNS in der Mutation *slitB1-32***  
 Präparation des ventralen ZNS in verschiedenen Entwicklungsstadien; Antikörperfärbungen mit anti-FasII ( A-D) und MAb BP102 (E-H); anterior ist links; (A/C/E/G) ZNS im Wildtyp, im Stadium 12 (A/E) und Stadium 16 (C/G). (B/D/F/H) Präparation des ZNS homozygot mutanter *slitB1-32* Embryonen; Die Antikörperfärbungen zeigen sowohl für anti-FasII als auch für MAb BP102 massive Defekte in der Organisation des ZNS. Nach dem Verlust der *slit*-Genfunktion kollabieren die ZNS-Axone an der Mittellinie.



**Abb. 20 Slit-Expression in der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>***

Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; Fokussierung auf das ventrale ZNS; (A-C) Homozygote *slit<sup>B1-32</sup>* Embryonen; (D-F) heterozygot *slit*-mutante Embryonen; das ZNS der Embryonen wurde mit anti-HRP (grün) markiert; zusätzlich wurden die Embryonen mit anti-Slit gefärbt (rot). Die Bilder zeigen Projektionen von Bildstapeln. (A) Kollaps der ZNS-Axone an der Mittellinie in homozygot mutanten *slit<sup>B1-32</sup>* Embryonen. (B) In homozygot mutanten Embryonen ist keine Slit-Expression nachweisbar. (E) in heterozygot mutanten Embryonen ist eine Slit-Expression in der ZNS-Mittellinie zu erkennen; (C/F) Überlagerung des anti-HRP und anti-Slit Signals.



anti-HRP gefärbt (Abb. 20). Anti-HRP markiert dabei alle Neurone des Nervensystems. Die Embryonen wurden mit Hilfe konfokaler Mikroskopie analysiert, dies erlaubt die gleichzeitige Darstellung der anti-SLIT- und anti-HRP-Färbung. Abb. 20A zeigt den Kollaps des ZNS in *slit*<sup>B1-32</sup> mutanten Embryonen (anti-HRP). In Abb. 20B ist zu erkennen, daß im Falle des Genverlustes kein SLIT-Protein in Mittellinienzellen mehr nachweisbar ist. Lediglich eine schwache Hintergrundfärbung ist vorhanden. Als Vergleich dient ein heterozygot *slit*-mutanter Embryo aus derselben Färbung (Abb. 20D-F).

### 3.3.2.1. Western-Blot-Analyse der SLIT-Expression in der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup>

Um den Verlust des Proteins nach dem Ausfall der Genfunktion in der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> zu verifizieren wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde ein Proteinextrakt aus homozygot mutanten Embryonen gewonnen, der mit wildtypischen Proteinextrakten verglichen wurde. Ein GFP markiertes Balancerchromosom erlaubt es dabei, am lebenden Embryo anhand der GFP-Expression eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Embryonen zu treffen. So können homozygote Embryonen anhand der fehlenden GFP-Expression selektioniert werden.

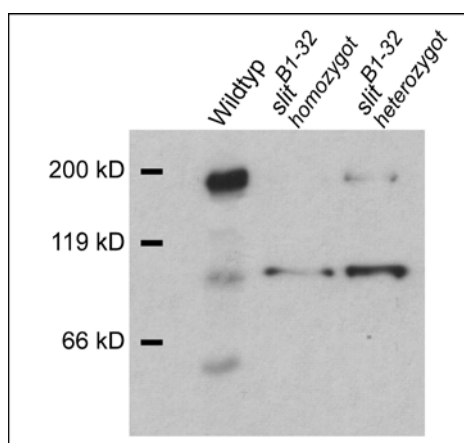


Abb. 21 Western-Blot-Analyse der SLIT-Expression in der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup>

Der Western-Blot zeigt einen Verlust der SLIT-Proteinexpression in homozygot mutanten *slit*<sup>B1-32</sup> Embryonen (Abb. 21). Im Vergleich zur wildtypischen Situation findet sich weder das vollständige Protein (ca. 190 kD) noch der proteolytisch

gesplattene C-terminale Teil von SLIT (ca. 55-60 kD). In heterozygot *slit*<sup>B1-32</sup> mutanten Embryonen ist das vollständige SLIT-Protein noch nachweisbar.

Somit konnte sowohl in Western-Blot-Analysen als auch in Antikörperfärbungen nachgewiesen werden, daß der Verlust der *slit*-Genfunktion in *slit*<sup>B1-32</sup> Embryonen zum kompletten Verlust des SLIT-Proteins führt.

### 3.3.3. Klonierung eines Epitop-markierten SLIT-Proteins

Um die Auswirkungen der Überexpression von SLIT im embryonalen Nervensystem zu untersuchen, wurde ein UAS-*slit*-Konstrukt kloniert. Bei der Klonierung wurde zusätzlich im N-terminalen Bereich von *slit* ein MYC-Tag eingefügt. So konnte ein *slit-myc*-Konstrukt generiert werden, das in seiner Expression sowohl im N-terminalen Bereich (MYC-Tag) sowie im C-terminalen Bereich (anti-SLIT Antikörper) nachweisbar ist. Nach der Klonierung von *slit-myc* in den UAS-Vektor steht dieses Konstrukt so verschiedenen Applikationen zur Verfügung. Zum einen wurde das entsprechende DNA-Konstrukt mittels Keimbahntransformation in *Drosophila* transformiert und mit Hilfe des Gal4-Systems ektopisch exprimiert. Zum anderen wurde das Konstrukt in Zellkultur exprimiert, um die proteolytische Spaltung und Sezernierung von SLIT genauer zu studieren.

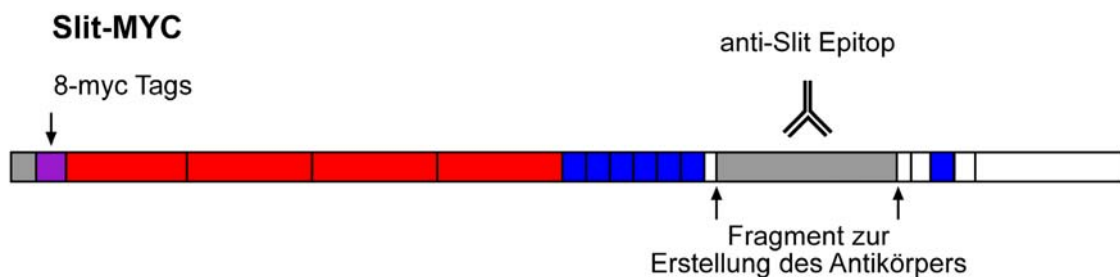


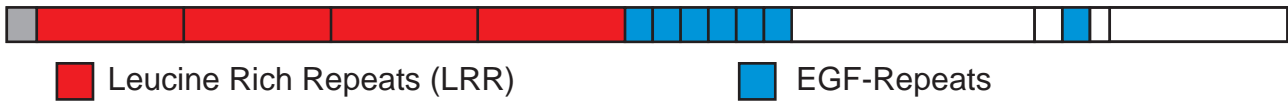
Abb. 22 Schematische Darstellung des klonierten *slit-myc*-Konstruktes.

#### 3.3.3.1. Klonierungsstrategie

Da keine komplette *slit*-cDNA zur Verfügung stand, wurde ein entsprechendes *slit-myc*-Konstrukt mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zusammengefügt. Abb. 23

## slit-DNA

1480 aa (4,44 kb)



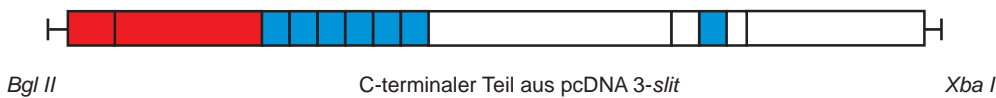
## Klonierungsstrategie zur Klonierung von UAS-sl原因-myc

1. Amplifikation des N-terminalen *slit*-Teils

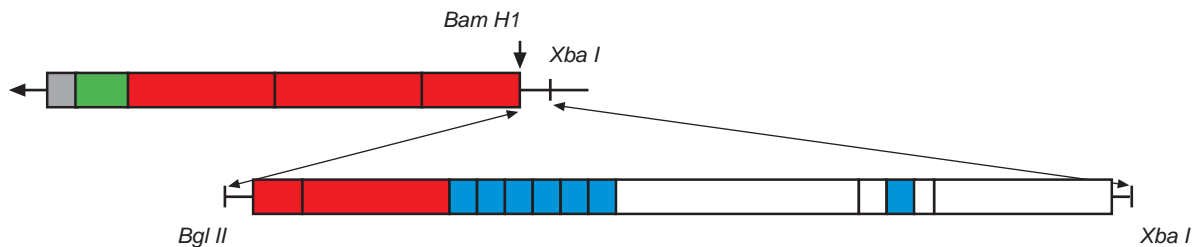
2. Klonierung des N-terminalen *slit*-Teils in den pKK31 Vektor



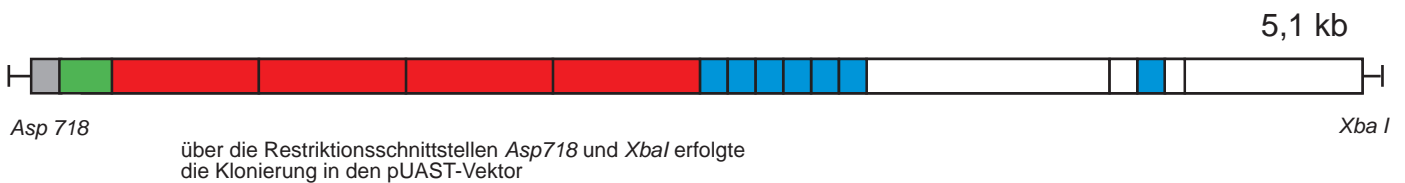
3. Restriktion und Aufreinigung des C-terminalen *slit*-Teils



4. Vervollständigung der *slit-myc*-cDNA



5. Klonierung der *slit-myc*-cDNA in den pUAST Vektor



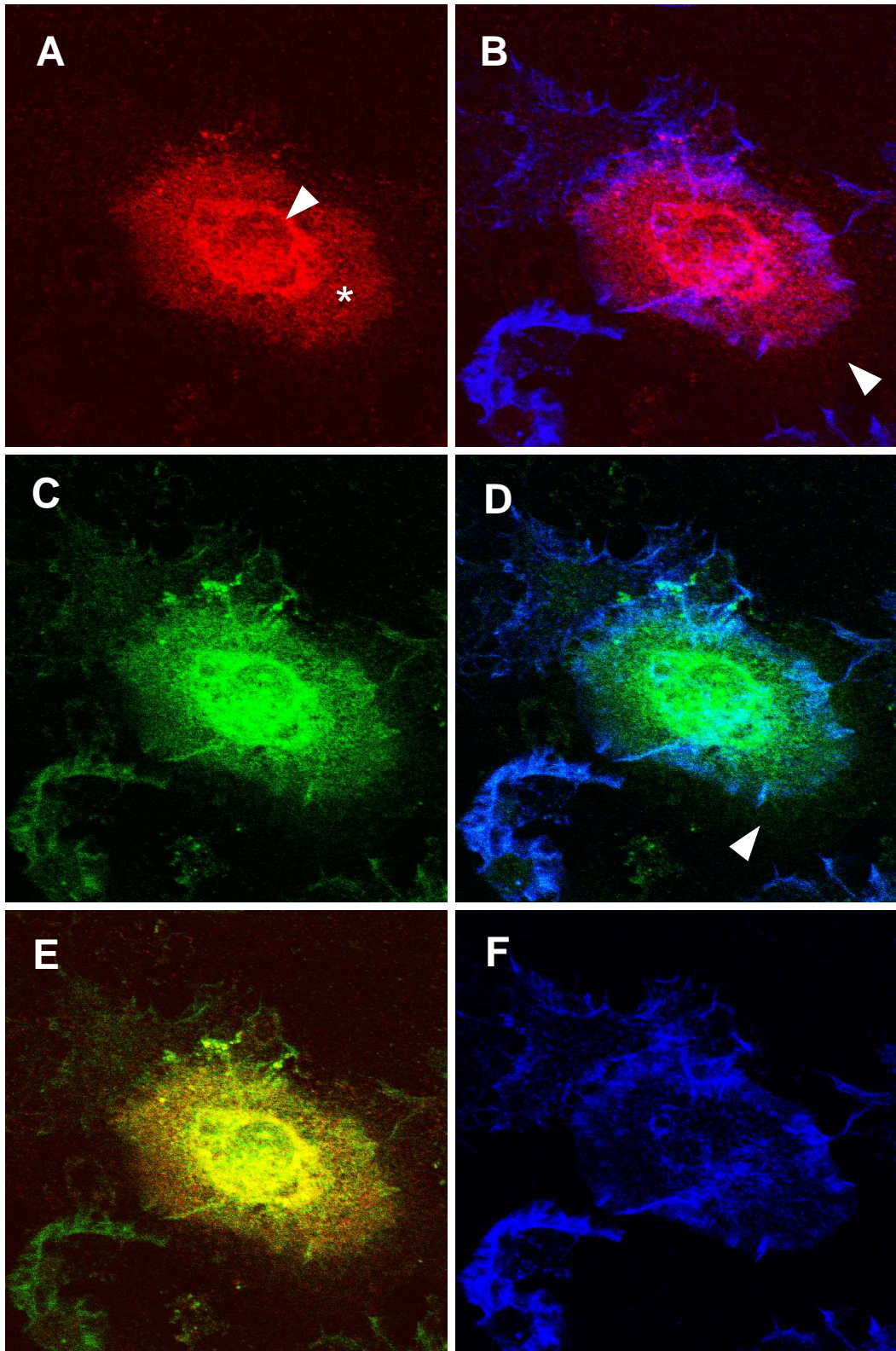
**Abb. 23 Schematische Darstellung der Klonierung des UAS-*slit-myc*-Konstruktes**  
Das *slit-myc*-Konstrukt wurde aus zwei verschiedenen cDNA's, gH09454 und pCDNA3-sl原因, sowie einem 8fach *myc*-Konstrukt, pKK31, kloniert. Das vollständig klonierte *slit-myc*-Konstrukt wurde anschließend in den pUAST-Vektor kloniert.

gibt schematisch einen Überblick über die einzelnen Schritte der Klonierung. Dabei wurden zwei verschiedene cDNA-Klone (gH09454 und pcDNA3-*slit*) sowie ein *myc*-Konstrukt (pKK-31) verwendet. Der N-terminale Teil des *slit*-Konstruktes wurde aus dem cDNA-Klon gH09454 kloniert, der C-terminale Teil stammt aus dem Klon pcDNA3-*slit*. Zunächst wurde der N-terminale *slit*-Teil mittels PCR aus dem Klon gH09454 amplifiziert und in das *myc*-Konstrukt pKK-31 kloniert. pKK-31 trägt nach einer SLIT-Signalsequenz eine Abfolge von acht *myc*-Repeats. Anschließend wurde der C-terminale *slit*-Teil über Restriktionen aus der cDNA pcDNA3-*slit* gewonnen. Dieser wurde dann in das bereits vorhandene *slit-Nterm-myc*-Konstrukt ligiert. So wurde eine vollständige *slit*-cDNA kloniert, die im N-terminalen Bereich ein MYC-Tag trägt. Die *slit-myc*-cDNA wurde anschließend in den pUAST-Vektor kloniert.

### 3.3.3.2. Expression in *Drosophila* S2-Zellen

Um das UAS-*slit-myc*-Konstrukt zu testen, wurde dieses zunächst in *Drosophila* Schneider-Zellen (S2-Zellen) transformiert und die Expression des MYC-Tags sowie der SLIT-Antikörper Erkennungssequenz kontrolliert. Durch Kotransfektion des UAS-*slit-myc*-Konstruktes mit einer Actin-5C-Gal4 DNA in S2-Zellen kann das *Slit-Myc*-Konstrukt exprimiert werden. Bei Actin-5C handelt es sich um einen endogenen Promoter aus *Drosophila*, der eine Expression des Gal4 in S2-Zellen ermöglicht. Nach erfolgter Kotransfektion wurden die *Drosophila* Zellen nach zwei Tagen fixiert und die MYC- und SLIT-Expression über Antikörperfärbungen analysiert.

Die Antikörperfärbung an *Drosophila* S2-Zellen zeigt eine deutliche Expression des MYC-Tags (Abb. 24A) sowie des anti-SLIT-Epitops (Abb. 24C). In Abb. 24E ist zu erkennen, daß beide Signale kolokalisieren. Eine genaue Betrachtung der subzellulären Lokalisation von SLIT-MYC in S2-Zellen zeigt eine ubiquitäre, cytoplasmatische Verteilung des ektopischen Proteins (Abb. 24A, Stern). Allerdings ist um den Zellkern herum eine deutlich stärkere Färbung zu erkennen (Abb. 24A, Pfeilkopf). Durch eine Phalloidin-Färbung wurde zusätzlich das Actin-Cytoskelett der S2-Zellen markiert (Abb. 24F) und so die Zellgrenzen der transfizierten Zellen visualisiert. In der Umgebung der Zellen ist bei einer genauen Betrachtung eine schwache SLIT- sowie MYC-Expression außerhalb der Zellen zu detektieren (Abb. 24B/D, Pfeilkopf). Dieses deutet auf eine Sezernierung des ektopischen SLIT-MYC-Proteins hin.



**Abb. 24 Expression von UAS-Slit-MYC in *Drosophila* S2-Zellen**

Antikörperfärbung an *Drosophila* S2-Zellen nach erfolgter UAS-Slit-MYC Expression; Antikörperfärbung mit anti-Slit (grün) und anti-MYC (PAb c-myc; rot); Visualisierung des Aktin-Cytoskeletts durch Phalloidin (blau). (A/C/E) Eine Expression von Slit-MYC ist ubiquitär im Cytoplasma zu erkennen (A, Stern); um den Zellkern herum ist die Färbung allerdings stärker (A, Pfeilkopf); (E) Kolokalisation der Signale (Überlagerung, gelb). Zudem findet sich sowohl eine (B) MYC- als auch eine (D) Slit-Expression außerhalb der Zellen (Pfeilkopf).

### **3.3.3.3. Etablierung transgener UAS-*slit-myc* Fliegen**

Um die Auswirkung einer ektoptischen SLIT-Expression im Embryo *in vivo* zu studieren wurde das UAS-*slit-myc*-Konstrukt mittels Keimbahntransformation in die Fliege gebracht. Nach erfolgreicher Transformation des pUAST-Konstruktes kann so in nachfolgenden Generationen das eingebaute Gen mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems in der Fliege exprimiert werden.

Es konnten elf transgene UAS-*slit-myc* Stämme etabliert werden. Dabei fanden sich zwei Insertionen auf dem X Chromosom, drei Insertionen auf dem 2. Chromosom und sechs Insertionen auf dem 3. Chromosom.

### **3.3.3.4. Ektopische Expression von UAS-*slit-Myc***

Die etablierten UAS-*slit-myc* Stämme wurden zunächst auf Ihre Expression hin untersucht. Dabei wurde getestet ob, nach Kreuzung transgener UAS-*slit-myc* Linien gegen verschiedene Gal4-Treiber eine SLIT- sowie eine MYC-Expression im jeweiligen Muster des Gal4-Treibers nachzuweisen ist. Anschließend wurde anhand von Rettungsexperimenten getestet ob ektoptisches SLIT-MYC *in vivo* funktional ist. Danach wurde die Auswirkung ektoptischer SLIT-MYC-Expression auf die Entwicklung des embryonalen ZNS analysiert und weiterhin die Verteilung des ektoptischen Proteins im Embryo genauer betrachtet.

#### **3.3.3.4.1. Test der UAS-*slit-myc* Stämme**

Zum Test der verschiedenen UAS-*slit-myc* Stämme wurden diese gegen unterschiedliche Gal4-Treiber gekreuzt. Dabei wurden Gal4-Treiber verwendet, die in einem Muster exprimieren, daß sich deutlich von der endogenen SLIT-Expression unterscheidet. Es wurden die UAS-*slit-myc* Stämme SLIT 1-14, SLIT 2-16, SLIT 2-7 und SLIT 2-19 verwendet. Diese wurden gegen unterschiedliche Gal4-Treiber getestet, unter anderem *Kr-Gal4* (*Krüppel*), *elav-Gal4*, *en-Gal4* (*engrailed*) und *sca-Gal4* (*scabrous*). Nach erfolgter ektoptischer Expression mittels der Gal4-Linien wurden Embryonen gesammelt und in Antikörperfärbungen auf ihre jeweilige SLIT-, bzw. MYC-Expression getestet.

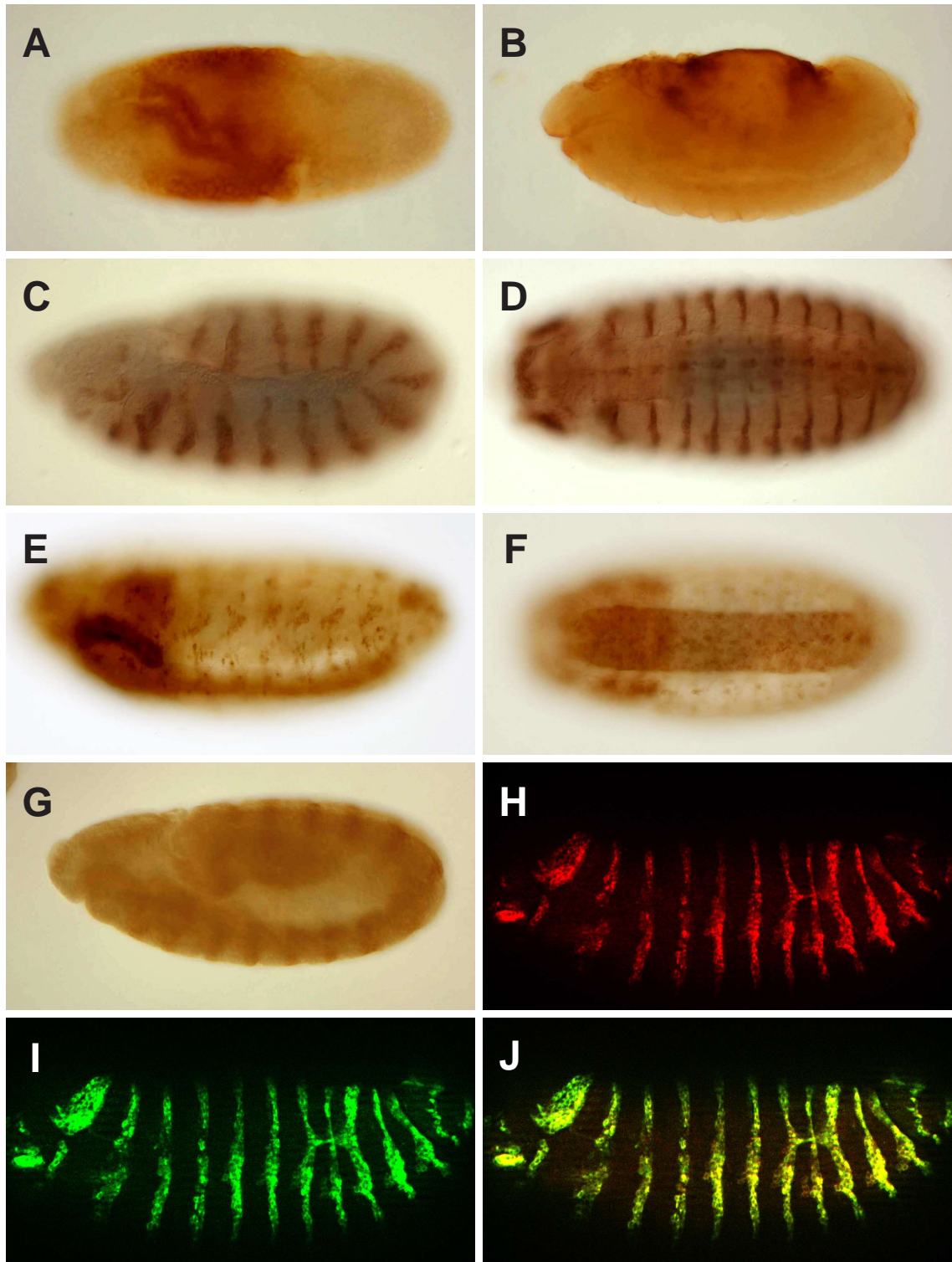
Alle verwendeten transgenen Stämme zeigen eine Expression von MYC und SLIT im jeweiligen Muster des verwendeten Gal4-Stammes. Abb. 25A/B zeigt eine MYC-Expression im *Krüppel*-Muster. In frühen Stadien exprimiert *Krüppel* in einem breiten Streifen entlang der dorsoventralen Achse. In späteren Stadien findet sich eine Expression in der Amnioserosa (Abb. 25B). Abb. 25C/D zeigt eine ektopische Expression im *en*-Gal4 Muster. In Abb. 25E/F ist eine MYC-Expression im *elav*-Muster zu erkennen. Neben einer MYC-Expression ist zudem eine schwache SLIT-Färbung im *engrailed*-Muster (Abb. 25G) zu beobachten. Die im Vergleich zum MYC-Signal recht schwache SLIT-Färbung ist allerdings nicht auf eine schwächere Expression, sondern auf den anti-SLIT-Antikörper zurückzuführen. Dieser ist methanol-sensitiv und erlaubt an nach Standardmethoden fixierten Embryonen nur eine schwache anti-SLIT-Färbung.

Um eine Koexpression von SLIT und MYC nachzuweisen, wurden zudem konfokale Analysen nach ektopischer SLIT-MYC-Expression durchgeführt. Hierzu wurde UAS-*slit-myc* mittels *en*-Gal4 ektopisch exprimiert und die Nachkommen auf eine MYC- und SLIT-Expression getestet. Die konfokalen Analysen zeigen eine Kolo-kalisation des SLIT- und MYC-Signals. Im *engrailed*-Muster ist eine überlappende Expression von SLIT und MYC zu beobachten (Abb. 25G-J). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Keimbahn-transformation erfolgreich war und auch in der Fliege das klonierte UAS-*slit-myc*-Konstrukt exprimiert wird.

#### 3.3.3.4.2. Rettung des *slit*<sup>B1-32</sup> Phänotyps durch UAS-*slit-myc*

Um die biologische Funktionalität des SLIT-MYC-Konstruktes *in vivo* nachzuweisen, wurde getestet, ob die ektopische Expression von SLIT-MYC im ZNS zu einer Rettung des mutanten *slit*<sup>B1-32</sup> Phänotyps führt. Hierzu wurden in den Hintergrund der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> verschiedene Gal4-Treiber sowie eine UAS-*slit-myc* Insertion gekreuzt, um im mutanten Hintergrund SLIT-MYC im Muster des jeweiligen Gal4-Treibers zu exprimieren. Dieser Ansatz wurde mit zweitchromosomalen Gal4-Treiberlinien durchgeführt. So wurden zunächst Rekombinanten für die Gal4-Treiberlinien *sim*-Gal4 sowie *slit*-Gal4 und der *slit*<sup>B1-32</sup> Mutation etabliert. In den Hintergrund der Rekombinanten wurde dann auf das dritte Chromosom eine UAS-*slit-myc* Insertion gekreuzt. Auf diese Weise konnten folgende Stämme etabliert werden:

- *slit*<sup>B1-32</sup>; *sim*-Gal4 / *Cyo*<sup>bb</sup>, UAS-*slit-myc* / UAS-*slit-myc*
- *slit*<sup>B1-32</sup>; *slit*-Gal4 / *Cyo*<sup>bb</sup>, UAS-*slit-myc* / UAS-*slit-myc*



**Abb. 25 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC**

*Whole mount* Präparate; anterior ist links; (A/B/C/E/G-J) ventral ist unten; (D/F) ventrale Ansicht; Nach ektopischer Expression von UAS-Slit-MYC mittels verschiedener Gal4 Treiberlinien wurde eine Antikörperfärbung mit anti-MYC (MAb 9E10; A-F) oder anti-Slit (G) durchgeführt; (A/B) Ektopische Expression im *Krüppel* Muster (*Kr-Gal4*); (C/D) MYC Expression im Muster der *en-Gal4* Linie; (E/F) *elav-Gal4* getriebene Expression; (G) Expression von Slit im *engrailed* Muster (*en-Gal4*); (H-J) ektopische Expression von Slit-MYC mittels *en-Gal4* und anschließende konfokale Analyse. Eine Antikörperfärbung mit anti-Slit (H) und anti-MYC (PAb c-myc, I) zeigt eine Kolokalisation der beiden Marker (gelb).

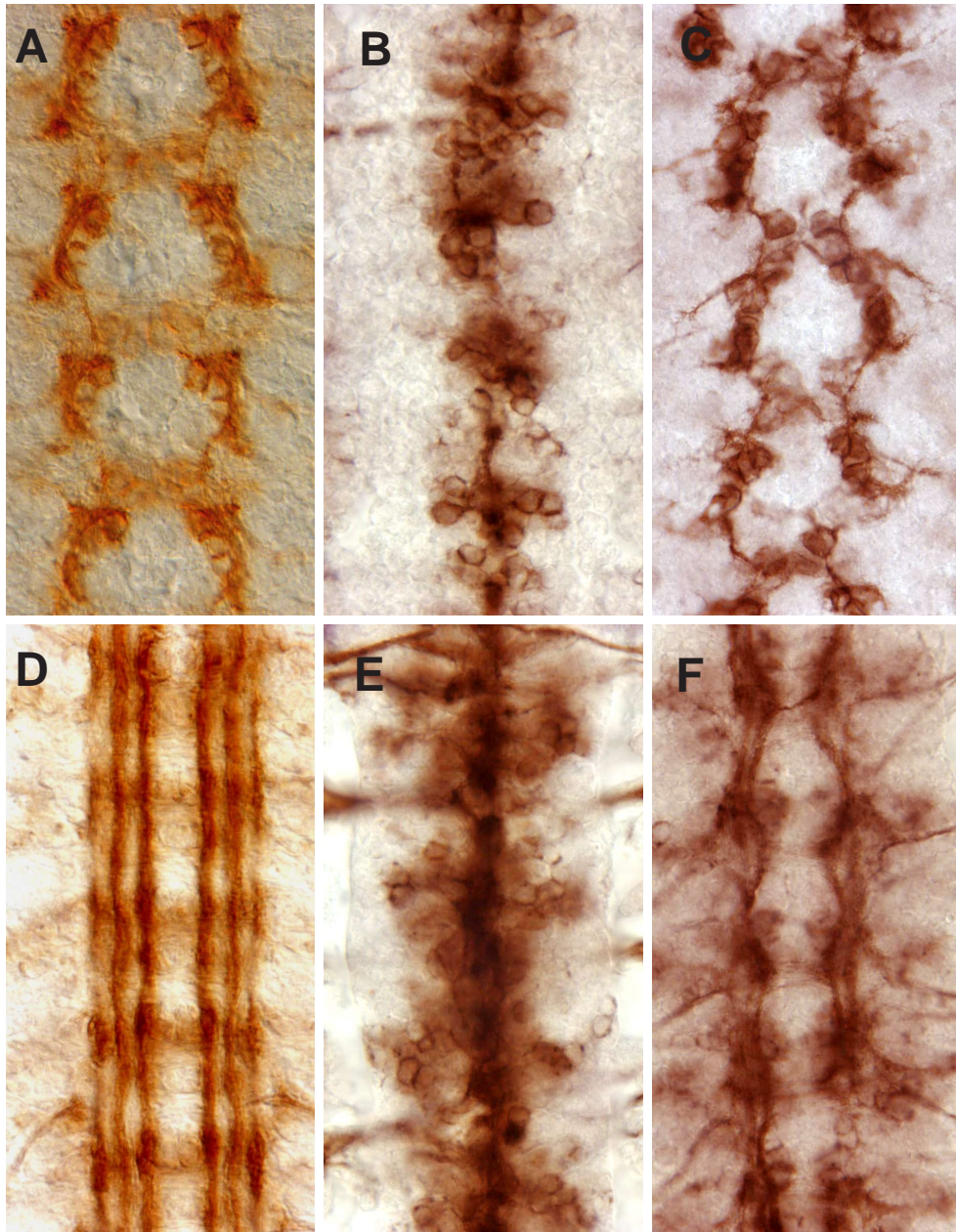


In den Nachkommen dieser Stämme ist ein Viertel aller Embryonen homozygot mutant für die Mutation *slit*<sup>B1-32</sup>, sowie homozygot für die Gal4-Linie und die SLIT-MYC Insertion. Diese Embryonen können durch die Verwendung eines "blauen Balancers" eindeutig identifiziert werden.

Die ektopische Expression von UAS-*slit-myc* im *sim*-Gal4- und *slit*-Gal4-Muster, im homozygot mutanten *slit*<sup>B1-32</sup> Hintergrund, führt zu einer partiellen Rettung des *slit*<sup>B1-32</sup> Ausfall-Phänotyps. Nach einer ektopischen Expression mittels *sim*-Gal4 ist in anti-FASII-Färbungen eine Trennung der longitudinalen Axontrakte an der Mittellinie zu erkennen (Abb. 26C/F). Zwar sind die Faszikel weiterhin unorganisiert, eine axonale Repulsion an der Mittellinie ist allerdings wieder zu beobachten (Abb. 26F). Auch eine ektopische Expression mittels *slit*-Gal4 führt zu einer partiellen Rettung (Abb. 27 D-F). Das kommissurale Wachstum ist nahezu wildtypisch und im Vergleich zur *slit*<sup>B1-32</sup> Mutation erfolgt eine eindeutige axonale Repulsion an der Mittellinie. Um die Expression von SLIT-MYC zu zeigen, wurden konfokale Analysen der Rettungsexperimente durchgeführt. So wurden Embryonen nach ektopischer Expression mittels *sim*-Gal4 mit anti-HRP und anti-Myc (MAb 9E10) gefärbt und konfokal analysiert (Abb. 27A-C). Die konfokale Analyse zeigt, daß in partiell geretteten Tieren SLIT-MYC in der ZNS-Mittellinie exprimiert wird.

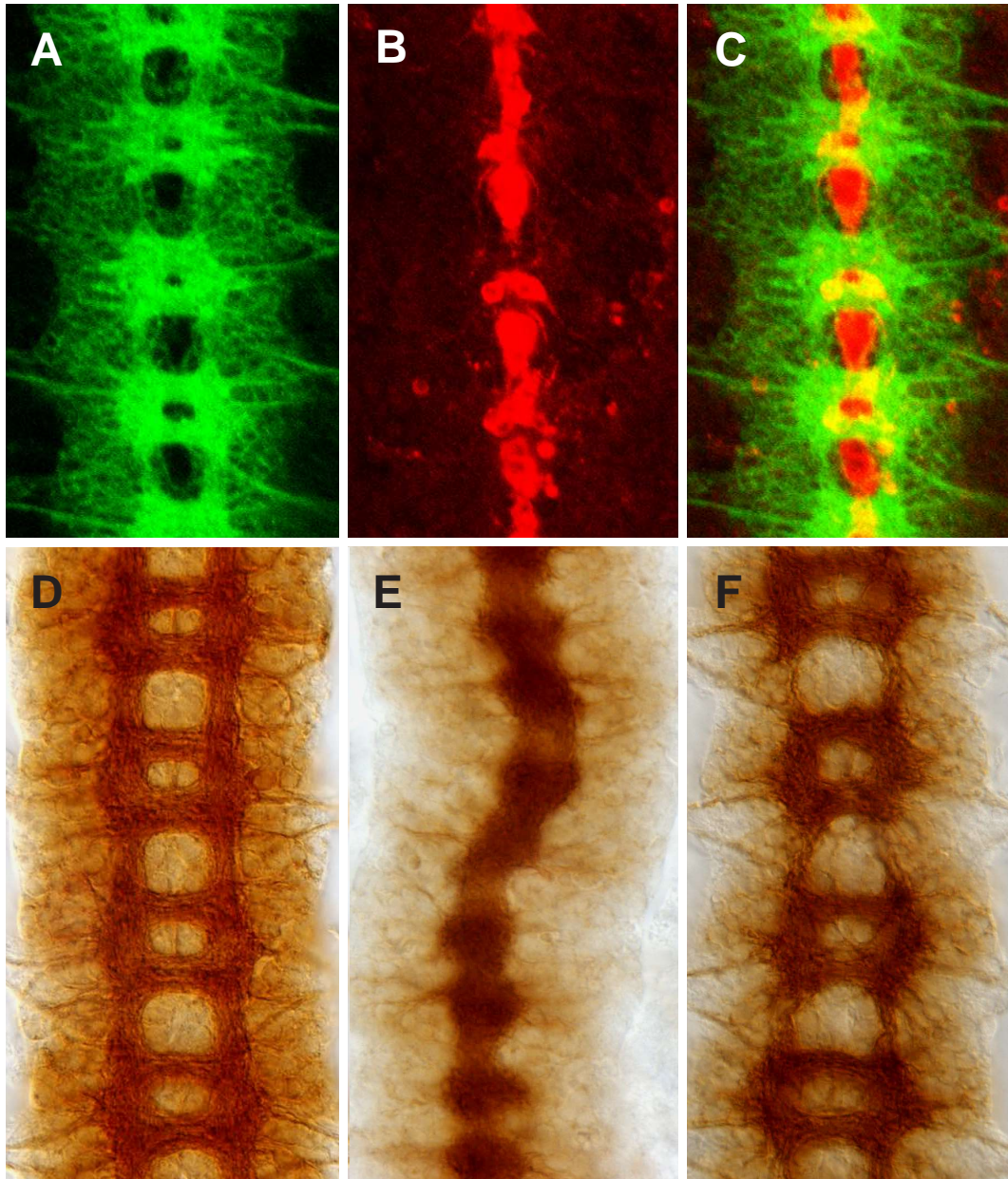
#### **3.3.3.4.3. Ektopische Verteilung von SLIT-MYC**

Zur Analyse der Verteilung des ektopisch exprimierten Proteins im *Drosophila* Embryo, wurden unterschiedliche UAS-*slit-myc* Stämme gegen verschiedene Gal4-Treiberlinien gekreuzt. Die Embryonen wurden gesammelt und die Expression des ektopischen SLIT-MYC wurde anhand verschiedener Antikörperfärbungen analysiert. Zunächst wurde die Verteilung in nicht neuronalen Geweben betrachtet. So wurde SLIT-MYC mittels *en*-Gal4 ektopisch exprimiert und anschließend die Expression von SLIT und MYC anhand von Antikörperfärbungen analysiert. Dabei zeigt sich sowohl eine SLIT- wie eine MYC-Färbung in den *engrailed* exprimierenden segmentalen Streifen entlang der dorsoventralen Achse (Abb. 28). In der Überlagerung der beiden Signale ist eine Kolokalisation von SLIT und MYC zu erkennen (Abb. 28E/F). Eine genaue Betrachtung der Expression in einer höheren Auflösung zieht eine punktierte Verteilung der SLIT-MYC-Expression ausserhalb der *engrailed* Expressionsdomäne (Abb. 28B/D/F). Eine Vergrößerung der Bereiche außerhalb der *en*-Gal4



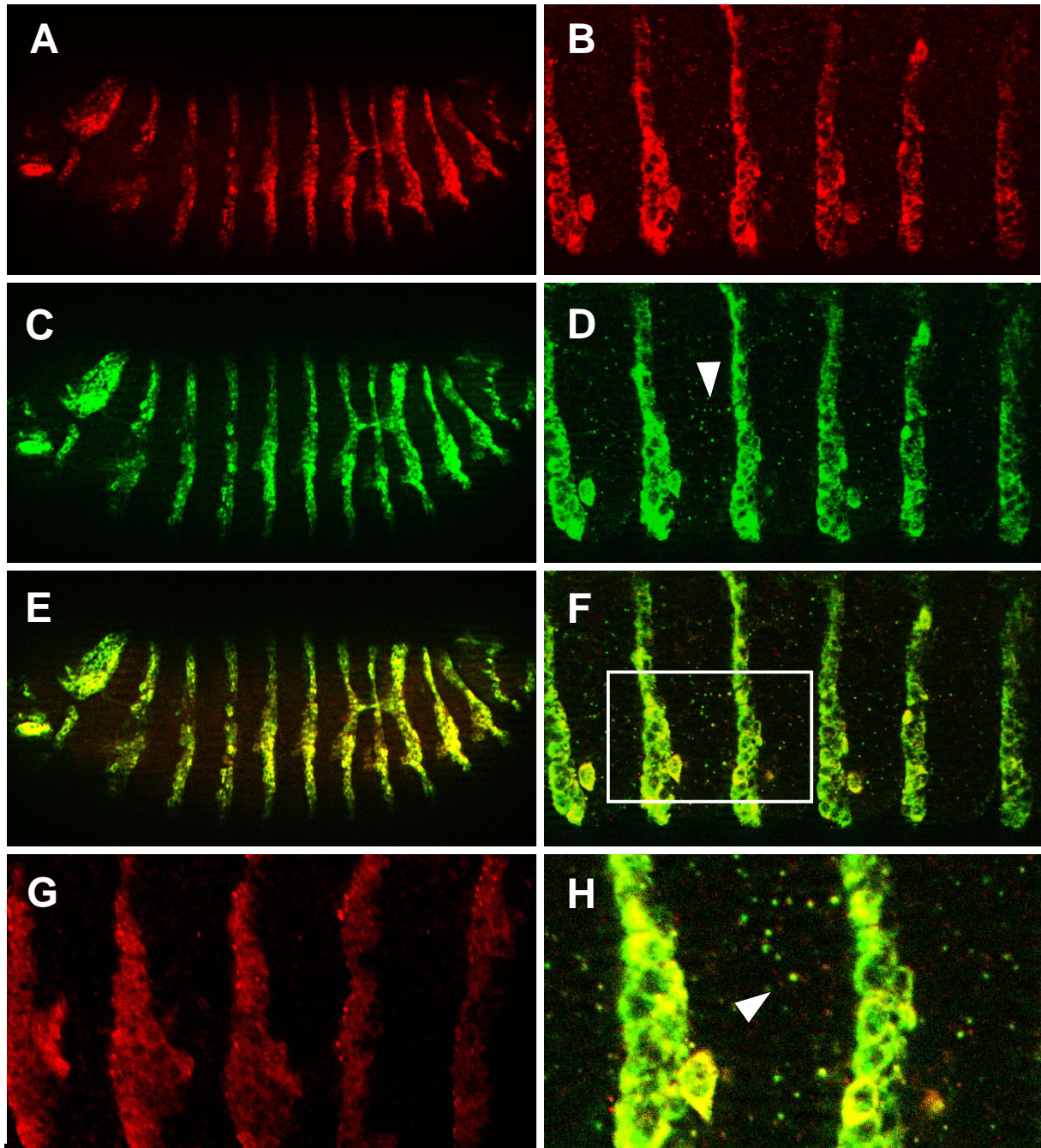
**Abb. 26 Rettung des ZNS Phänotyps der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>* nach ektopischer Slit-MYC Expression**

Präparation des ventralen ZNS in verschiedenen Entwicklungsstadien; Antikörperfärbungen mit anti-FasII; anterior ist oben; (A/D) ZNS im Wildtyp; (B/E) *slit* Nullmutation *slit<sup>B1-32</sup>*; (C/F) ektopische Expression von Slit-MYC im *sim*-Gal4 Muster im Hintergrund der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>*. (A-C) Stadium 12, (D-F) Stadium 16. Die Antikörperfärbungen zeigen das der ZNS Phänotyp der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>* durch eine ektopische Slit-MYC Expression in der ZNS-Mittellinie partiell gerettet werden kann. (C/F) Nach ektopischer Expression ist eine Trennung der Faszikel in der Mittellinie zu beobachten.



**Abb. 27 Rettung des ZNS Phänotyps der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>* nach ektopischer Slit-MYC Expression**

(A-C) Konfokale Analyse am *whole mount*; anterior ist oben; Fokussierung auf das ventrale ZNS; Antikörperfärbungen mit anti-HRP (grün) und anti-MYC (MAb 9E10, rot). Eine ektopische Expression von Slit-MYC im Hintergrund der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>*, mittels *sim*-Gal4, führt zu einer partiellen Rettung des Ausfallphänotyps. (B) In der ZNS-Mittellinie ist eine eindeutige Slit-MYC Expression zu erkennen. (D-F) Präparation des ventralen ZNS im Stadium 16; anterior ist oben; Antikörperfärbung mit MAb BP102. (D) ZNS im Wildtyp; (E) ZNS Phänotyp der Mutation *slit<sup>B1-32</sup>*. (F) Eine ektopische Expression von Slit-MYC mittels *slit*-Gal4 führt ebenfalls zu einer partiellen Rettung des Ausfallphänotyps.

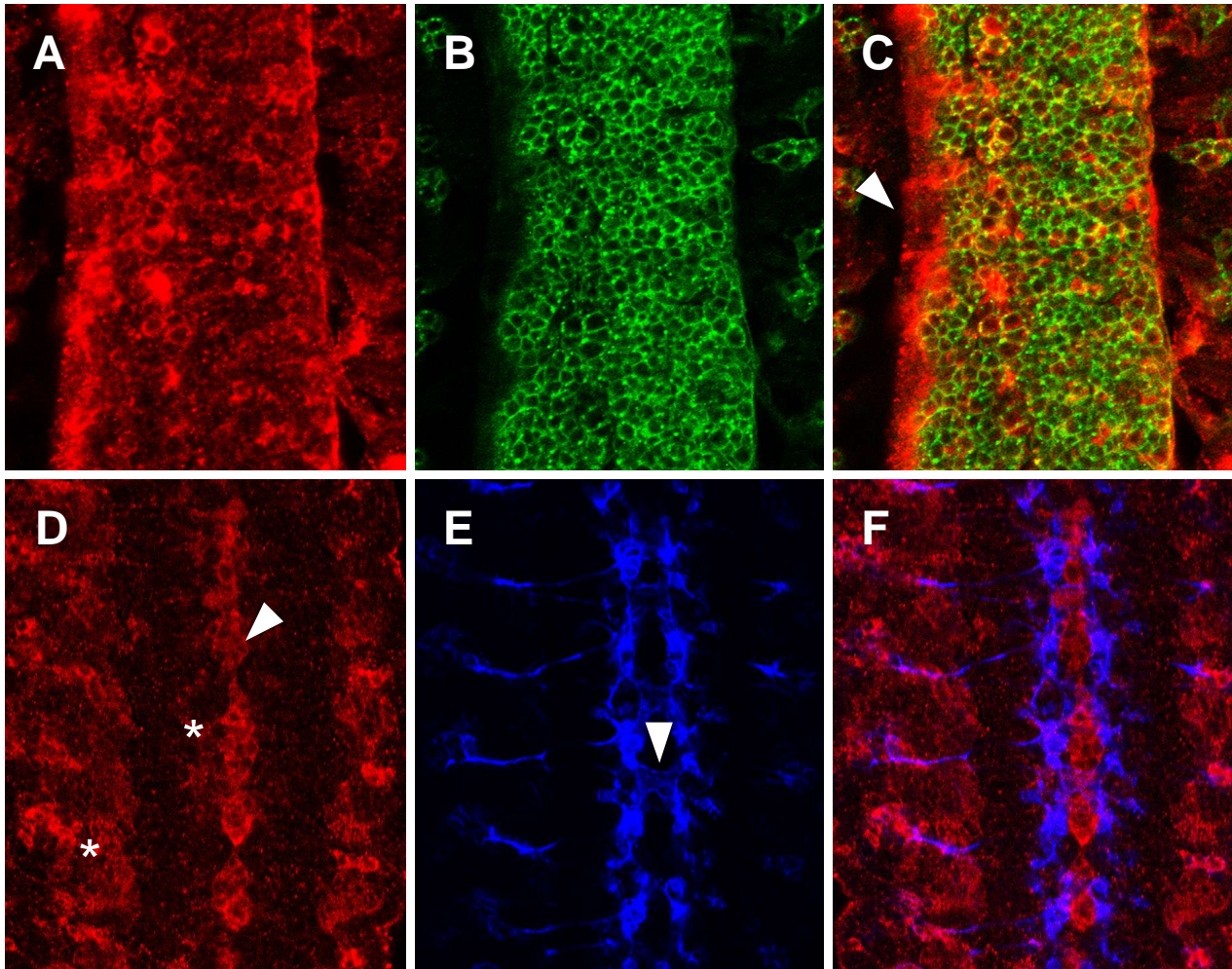


**Abb. 28 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; anterior ist links, ventral ist unten; laterale Ansicht; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *en-Gal4*. (A/B) Antikörperfärbung mit anti-Slit (rot) und (C/D) anti-MYC (PAb c-myc, grün); (E-H) Überlagerung der beiden Signale (gelb). (A/C/E) In der Übersicht des Embryo ist eine Kolokaisation des Slit- und MYC-Signals zu erkennen; (B/D/F) Die Vergrößerung der lateralen Ansicht zeigt eine punktierte Expression außerhalb der wildtypischen *engrailed*-Expressionsdomäne (D Pfeilkopf). (H) Die beiden punktierten Signale kolokalisieren (H, Pfeilkopf), wie in einer Vergrößerung (Kasten markiert vergrößerten Bereich) zu erkennen ist. (G) *en-Gal4* Expressionsdomäne, visualisiert mittels UAS-lacZ; Antikörperfärbung mit anti-βGal.

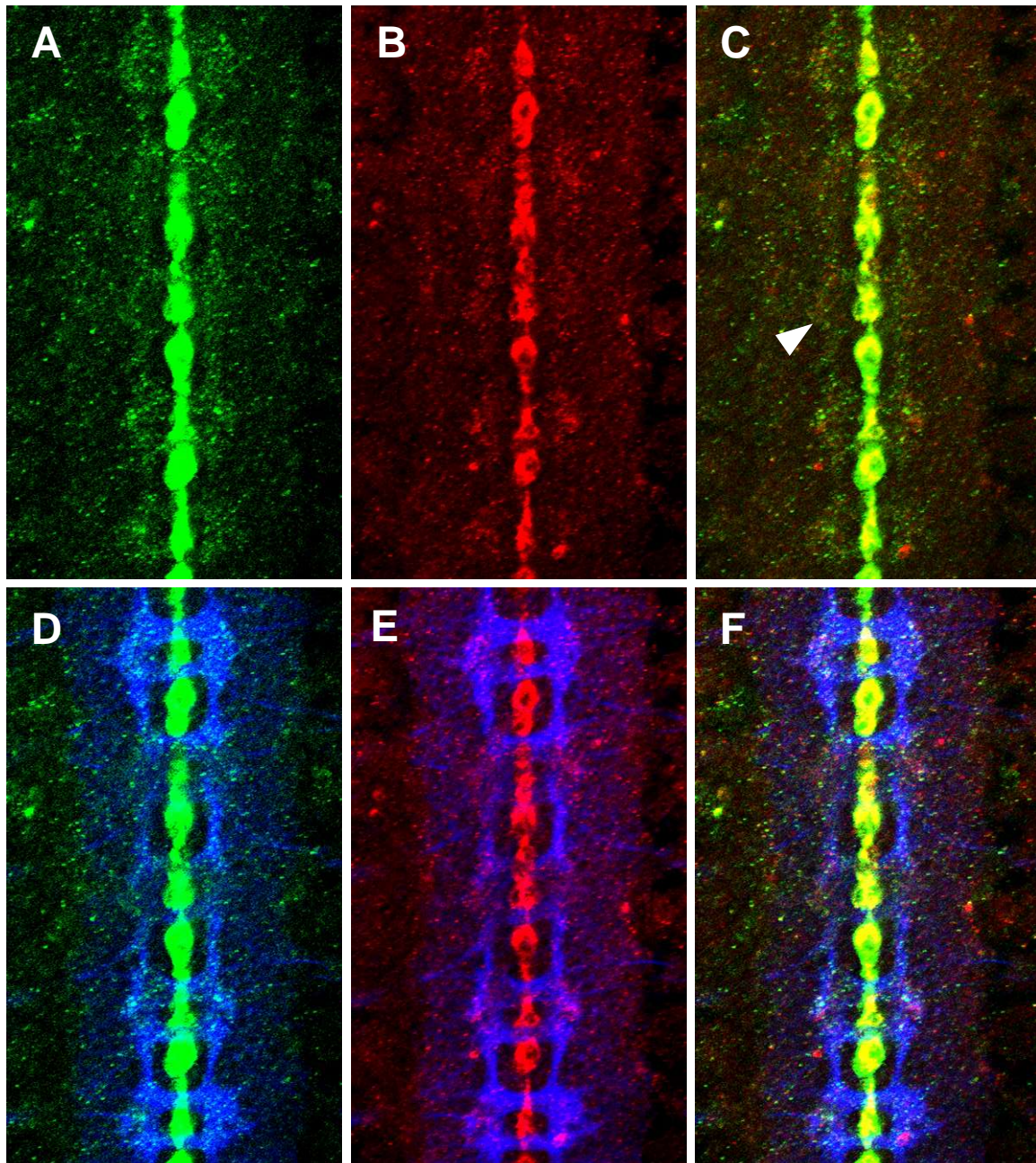
Expressionsdomäne (Abb. 28H) zeigt, daß auch die punktierte SLIT- und MYC-Expression kolokalisiert (Abb. 28H, Pfeilkopf). So ist anzunehmen, daß es sich bei dieser punktierten Färbung tatsächlich um eine SLIT-MYC Expression und nicht um eine Hintergrundfärbung handelt.

Für die Expression des SLIT-MYC-Konstruktes im kompletten ZNS wurden die Gal4-Stämme *elav-Gal4* und *rho-Gal4* verwendet. Nach ektopischer Expression mittels *elav-Gal4* findet sich eine MYC-Expression im kompletten Neuropil (Abb. 29A). In der Überlagerung mit anti-HRP ist eine Kolokalisation des MYC-Signals mit dem neuronalen Marker zu erkennen (Abb. 29C). Zudem zeigt sich eine starke MYC-Expression besonders in den lateralen Bereichen des Neuropils (Abb. 29C Pfeilkopf). Nach einer Expression im *rho-Gal4*-Muster zeigt sich eine MYC-Expression in Zellen der Mittellinie (Abb. 29D, Pfeilkopf) sowie auf einigen Axonbahnen im ZNS und PNS (Abb. 29D, Stern). In einer Überlagerung des MYC-Signals mit anti-FASII ist diese axonale Expression zu erkennen (Überlagerung violett). In Abb. 29E ist zudem zu erkennen, daß die ektopische SLIT-MYC Expression mittels *rho-Gal4* zu Defekten im ZNS führt. Die longitudinalen Faszikel liegen sehr nahe an der ZNS-Mittellinie und einige Axone kreuzen diese im Gegensatz zur wildtypischen Situation (Abb. 29E, Pfeilkopf). Eine genaue phänotypische Analyse folgt unter 3.3.3.4.4.

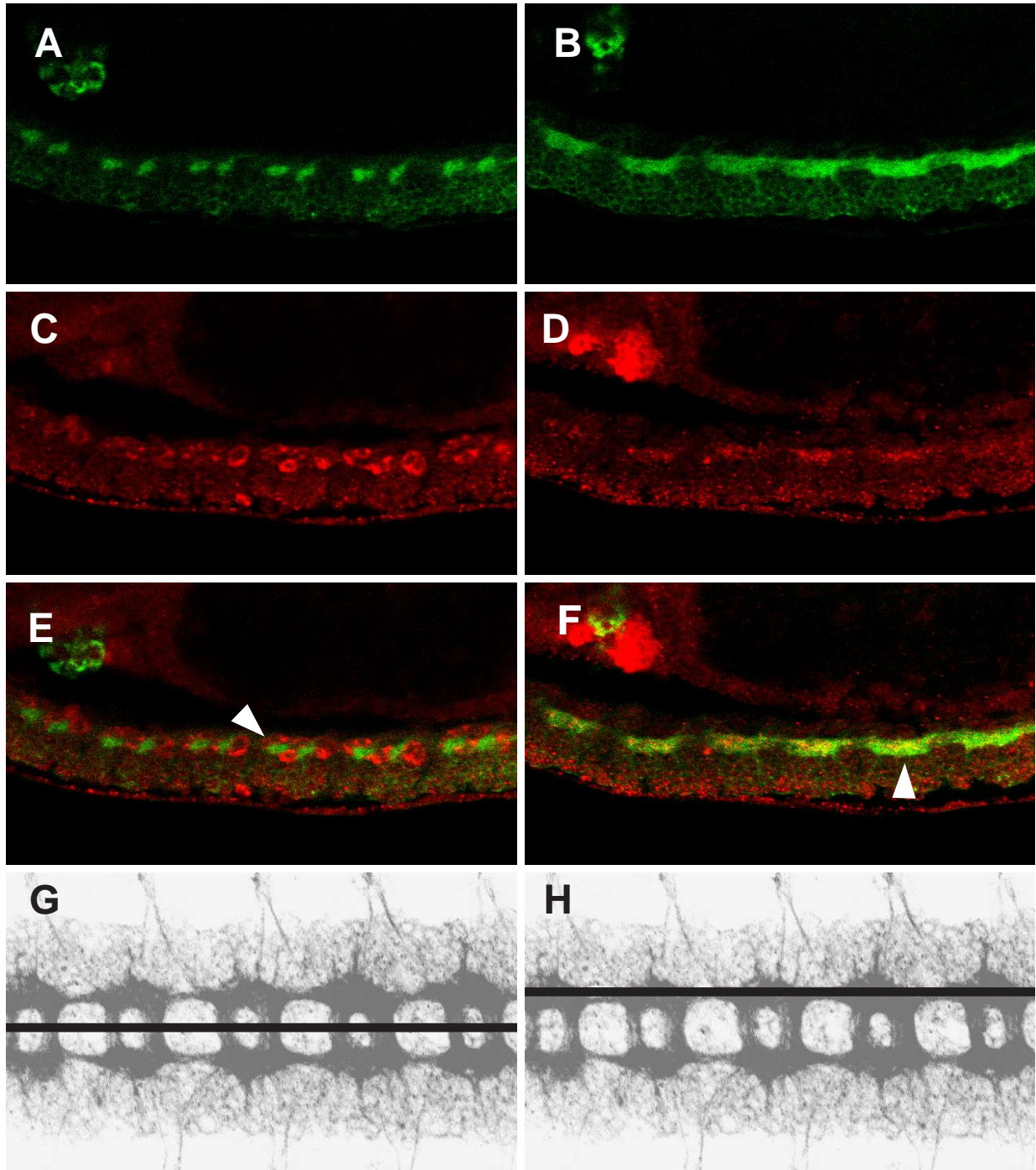
Anschließend wurde UAS-SLIT-MYC mittels *sim-Gal4* und *slit-Gal4* in der Mittellinie exprimiert. Nach ektopischer Expression von SLIT-MYC im *sim-Gal4* Muster zeigt sich eine Koexpression von MYC und SLIT in Mittellinienzellen (Abb. 30C, Pfeilkopf). Dabei scheint die MYC-Expression in der Mittellinie stärker zu sein als das SLIT-Signal. Dies ist in der Überlagerung zu erkennen, da in einigen Bereichen der Mittellinie lediglich eine MYC-Expression festzustellen ist. Neben der Mittellinien-Expression findet sich zudem eine SLIT- und MYC-Expression lateral der Mittellinie (Abb. 30A/B, Stern). Eine Überlagerung mit anti-HRP deckt auf, daß diese laterale Expression in der Ebene der Axone des ZNS liegt (Abb. 30D-F). Eine Betrachtung der ektopischen Expression in einer lateralen Ansicht eines Embryo bestätigt die axonale Expression von SLIT-MYC (Abb. 31). Bei einer Fokussierung auf die ZNS-Mittellinie in der lateralen Ansicht (Abb. 31A/C/E) ist zu erkennen, daß die Expression von SLIT (rot) nicht mit dem neuronalen Marker anti-HRP (grün) kolokalisiert (Abb. 31E, Pfeilkopf). In lateralen Bereichen des ZNS (Abb. 31B/D/F) hingegen ist ebenfalls eine Kolokalisation von SLIT und anti-HRP zu beobachten (Abb. 31F, Pfeilkopf). Auch für eine MYC-Expression konnte in der lateralen Ansicht eine axonale Expression bestätigt werden (Abb. 32). Neben der Expression an der ZNS-Mittellinie findet sich in konfokalen



**Abb. 29 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Analyse am *whole mount*; anterior ist oben; Fokussierung auf das ventrale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels (A-C) *elav-Gal4* und (D-F) *rho-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-MYC (MAb 9E10,rot), anti-HRP (grün) und anti-FasII (blau).(A) Eine ektopische Expression mittels *elav-Gal4* resultiert in einer MYC-Expression im kompletten Neuropil. (C) Insbesondere in lateralen Bereichen des Neuropils findet sich eine starke MYC-Expression, die über das Neuropil hinausgeht (Pfeilkopf); dies ist in einer Überlagerung mit anti-HRP zu erkennen (gelb). (D) Nach ektopischer Expression mittels *rho-Gal4* findet sich eine MYC-Expression in der ZNS-Mittellinie (Pfeilkopf) sowie auf Axonen im ZNS und PNS (Stern); die axonale Expression zeigt eine Überlagerung mit anti-FasII (violett). Zudem führt die Expression von Slit-MYC im *rho-Gal4* Muster zu Defekten im ZNS. (E) Die longitudinalen Axone liegen näher zur Mittellinie und einige Axone kreuzen diese (Pfeilkopf).



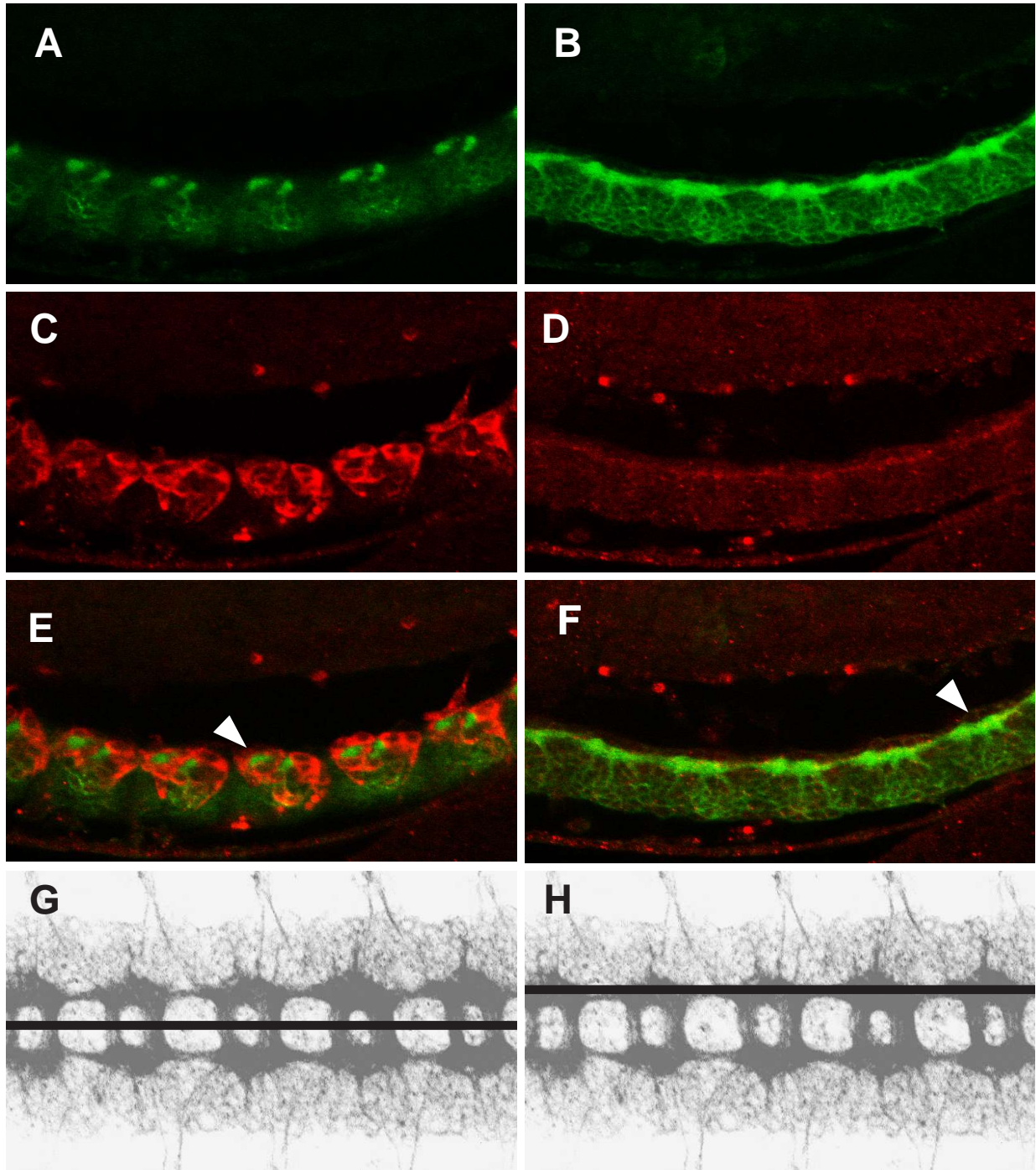
**Abb. 30 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; anterior ist oben; ventrale Ansicht; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *sim-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün), anti-Slit (rot) und anti-HRP (blau); (C) Überlagerung des MYC- und Slit-Signals (gelb); (D-F) Überlagerungen mit anti-HRP. In der ZNS-Mittellinie findet sich eine deutliche (A) MYC- und (B) Slit-Expression die eindeutig kolokalisiert ist. Neben der Expression in Mittellinienzellen findet sich eine laterale Expression (C Pfeilkopf). Die Überlagerung des Slit-MYC Signals mit anti-HRP zeigt die laterale Expression in der Ebene der Axone des ZNS (D-F).



**Abb. 31 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**

Konfokale Analyse am *whole mount*; laterale Ansicht; anterior ist links; ventral ist unten; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-SLIT-MYC mittels *sim-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-HRP(grün) und anti-Slit (rot); (E/F) Überlagerung der beiden Signale (gelb); (G/H) Schematische Darstellung der Schnittebenen, (G) für (A/C/E) und (H) für (B/D/F). In der lateralen Ansicht ist eine axonale Expression von Slit-MYC nachzuweisen. (A/C/E) Bei einer Fokussierung auf die Ebene der ZNS-Mittellinie (G), ist in der Überlagerung des Slit- und HRP-Signals zu erkennen, daß keine Slit-Expression mit einer HRP-Färbung überlappt (Pfeilkopf).(B/D/F) Dagegen ist in lateralen Bereichen des ZNS (H) eine eindeutige Überlappung der Slit-Expression mit anti-HRP positiven Axonen zu erkennen (gelb, Pfeilkopf).





**Abb. 32 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**

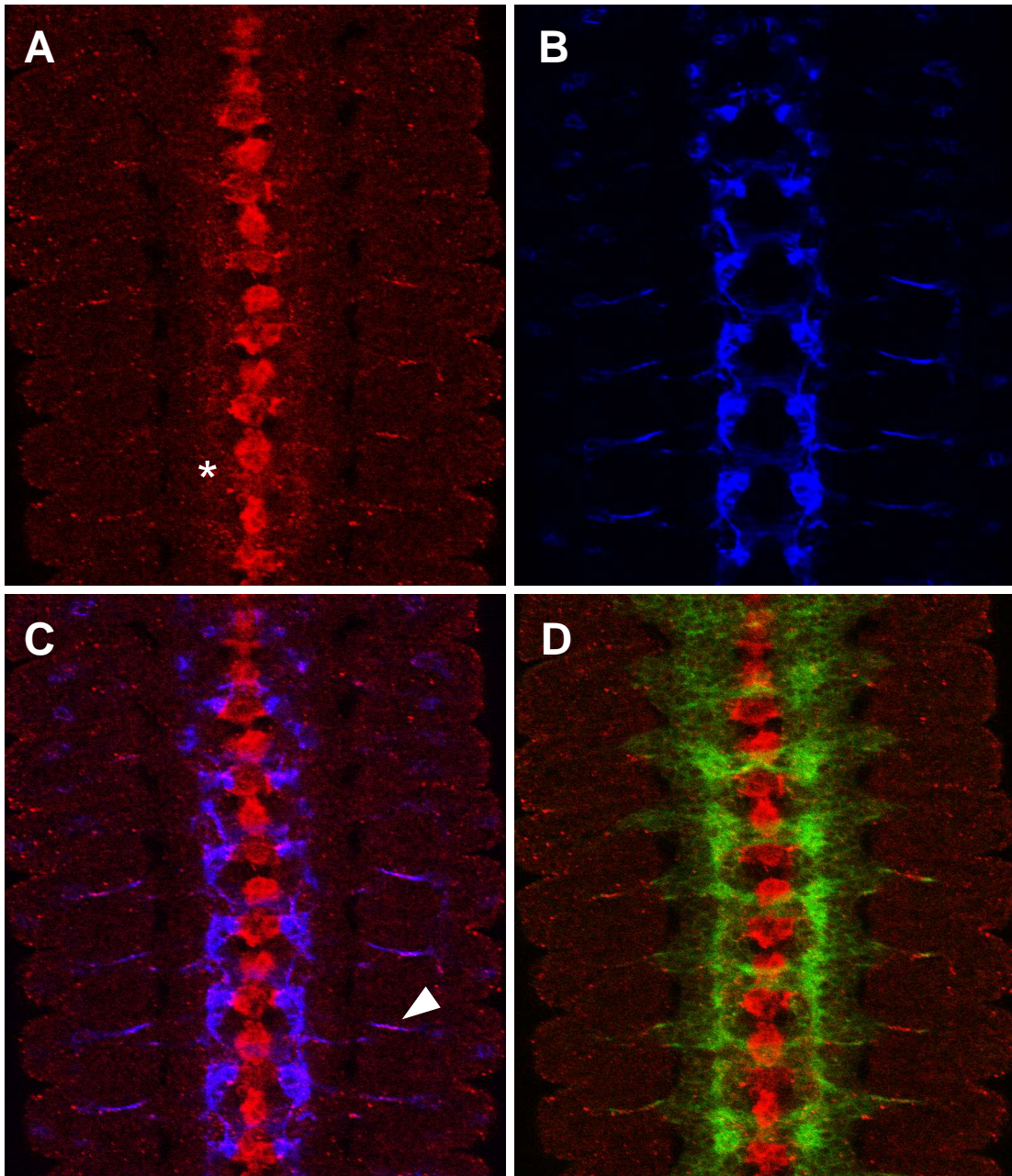
Konfokale Analyse am *whole mount*; laterale Ansicht; anterior ist links; ventral ist unten; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *sim-Gal4*. (A/B) Färbung mit anti-HRP (grün) und (C/D) anti-MYC (MAb 9E10; rot); (E/F) Überlagerung der beiden Signale (gelb); (G/H) Schematische Darstellung der Schnittebenen, (G) für (A/C/E) und (H) für (B/D/F). In der lateralen Ansicht ist eine axonale Expression von MYC nachzuweisen. (A/C/E) Bei einer Fokussierung auf die Ebene der ZNS-Mittellinie (G), ist in der Überlagerung des MYC und HRP Signals zu erkennen, daß keine Slit Expression mit einer HRP Färbung überlappt (Pfeilkopf). (B/D/F) Dagegen ist in lateralen Bereichen des ZNS (H) eine eindeutige Überlappung der MYC Expression mit anti-HRP positiven Axonen zu erkennen (gelb, Pfeilkopf).

Analysen eine weitere MYC Expression auf Axontrakten im PNS (Abb. 33). In einer Überlagerung mit anti-FASII kann diese axonale Expression bestätigt werden (Abb. 33C, Pfeilkopf). In anti-SLIT-Färbungen konnte keine deutliche Expression im PNS beobachtet werden, was allerdings auf die starke Hintergrundfärbung des anti-SLIT-Antikörpers zurückgeführt werden kann.

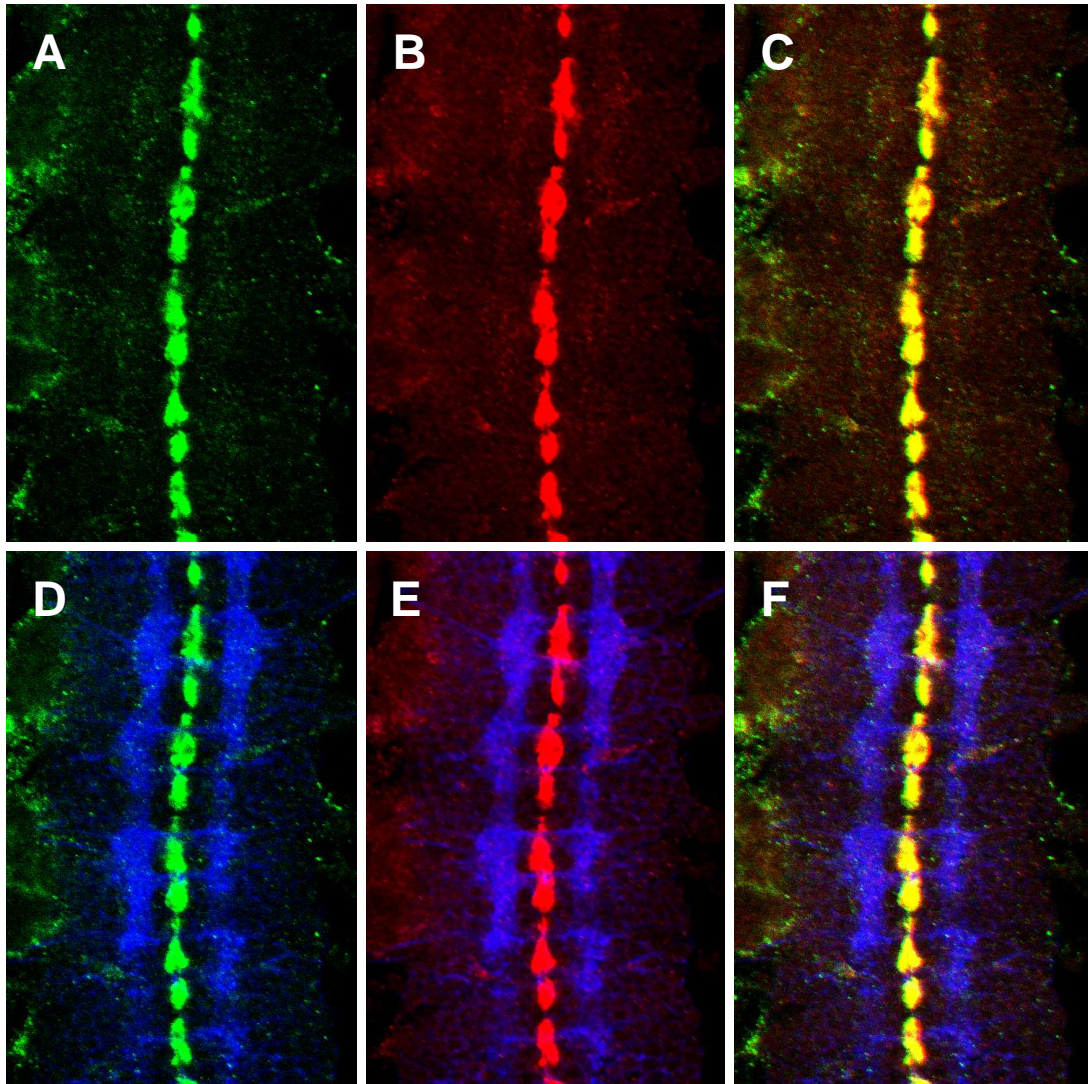
Nach einer ektopischen Expression von SLIT-MYC im *slit*-Gal4 Muster zeigt sich eine Expression in den Mittelliniengliazellen (Abb. 34). Dabei ist eine Kolokalisation des MYC- und des SLIT-Signals zu beobachten (Abb. 34C, Pfeilkopf). Eine genaue Betrachtung der Expression von SLIT-MYC nach ektopischer Expression im *slit*-Gal4 Muster, zeigt im Vergleich zur Expression mittels *sim*-Gal4 keine Expression in lateralen Bereichen des ZNS. Auch in der lateralen Ansicht ist lediglich eine Expression in der Mittellinie zu erkennen (Abb. 35). Zusätzlich zeigt auch die laterale Ansicht eine Kolokalisation der SLIT und MYC Expression (Abb. 35E). In früheren Stadien der Embryonalentwicklung ist ebenfalls eine Kolokalisation der MYC und SLIT Expression zu erkennen (Abb. 36C, Pfeilkopf). In einer ventralen Ansicht zeigt sich allerdings in frühen Entwicklungsstadien neben der Expression in der Mittellinie eine MYC Expression in lateralen Bereichen des ZNS (Abb. 36E, Pfeilkopf).

#### **3.3.3.4.4. Defekte in der ZNS Organisation nach ektopischer SLIT-MYC-Expression**

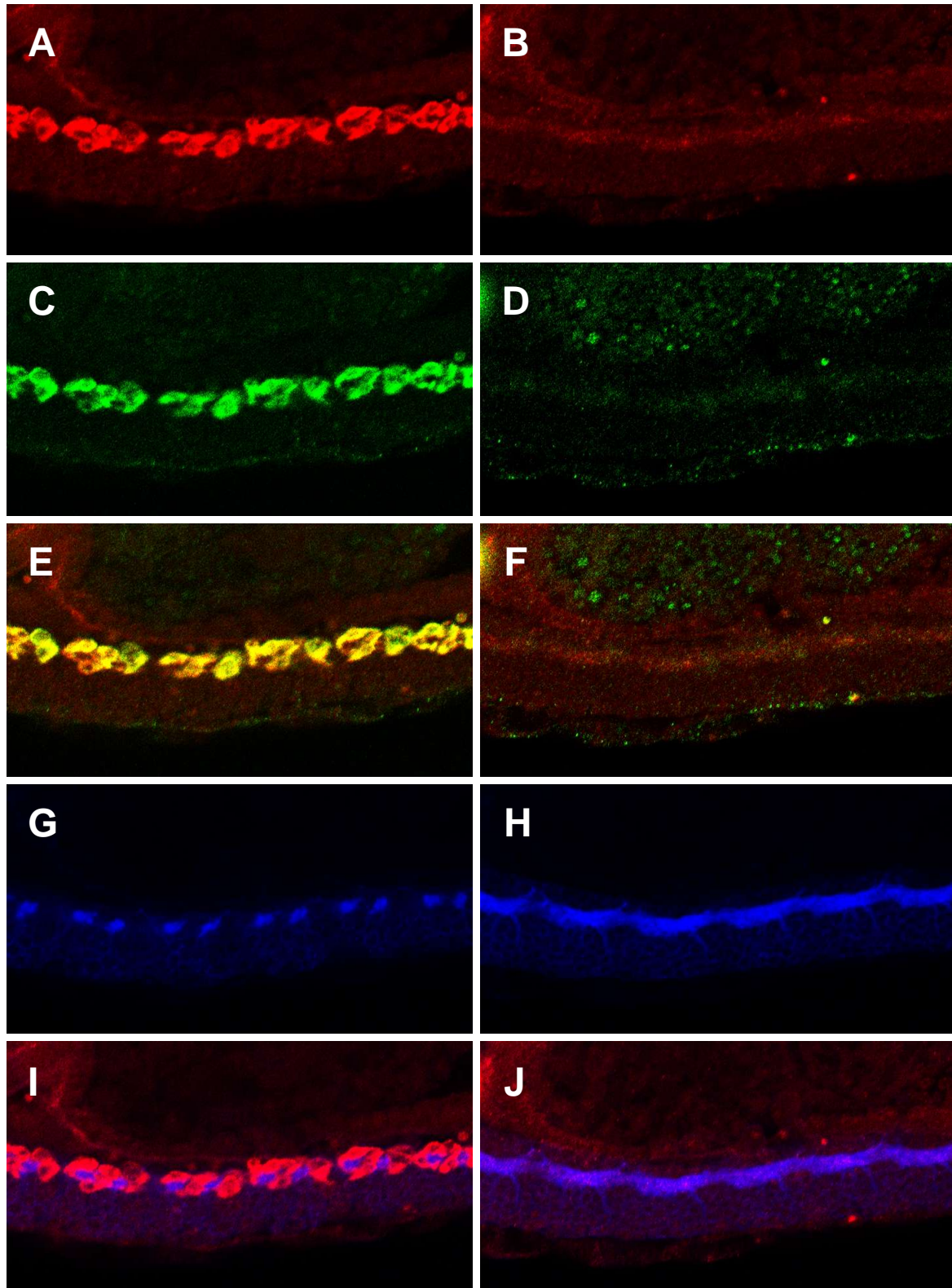
Die ersten Untersuchungen nach ektopischer SLIT-MYC Expression (3.3.3.4.3) deckten keine schwerwiegenden Defekte in der Entwicklung des ZNS auf. Lediglich eine Expression mittels *rho*-Gal4 resultierte in leichten Defekten in der Organisation der longitudinalen Faszikel (Abb. 29E). Erst nach Erhöhung der Dosis durch die Kombination zweier UAS-SLIT-MYC Insertionslinien (*slit* 2-16 zweitchromosomal und *slit* 2-7 drittchromosomal), konnten nach ektopischer Expression im *rhomboid*-Muster deutliche Defekte in der axonalen Organisation des ZNS identifiziert werden (Abb. 37). Die Defekte finden sich sowohl in Färbungen mit MAb BP102 als auch mit anti-FasII. In MAb BP102 Färbungen (Abb. 37B/C) ist zu erkennen, daß nach ektopischer Expression die Kommissuren verdickt, bzw. leicht fusioniert sind (Abb. 37B, Pfeilkopf). Der interkommissurale Raum ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner und das ZNS ist schmaler (Abb. 37B, Stern). In anti-FASII Färbungen zeigt sich ebenfalls, daß die longitudinalen Axontrakte näher beieinander liegen. Das ZNS



**Abb. 33 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Analyse am *whole mount*; anterior ist oben; ventrale Ansicht; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *sim-Gal4*. (A) Färbung mit anti-MYC (PAb c-myc, rot), (B) anti-FasII (blau) und (D) anti-HRP (grün); (C) Überlagerung der MYC- und FasII-Signale (violett); (D) Überlagerung der MYC- und HRP-Signale (gelb). (A) Neben der Expression in Mittellinienzellen ist eine Expression von MYC in lateralen Bereichen des ZNS zu erkennen (Stern); zudem zeigt sich eine Expression auf Axontrakten im PNS. (C) Kolokalisation der MYC-Expression mit anti-FasII positiven Axonen (Pfeilkopf).

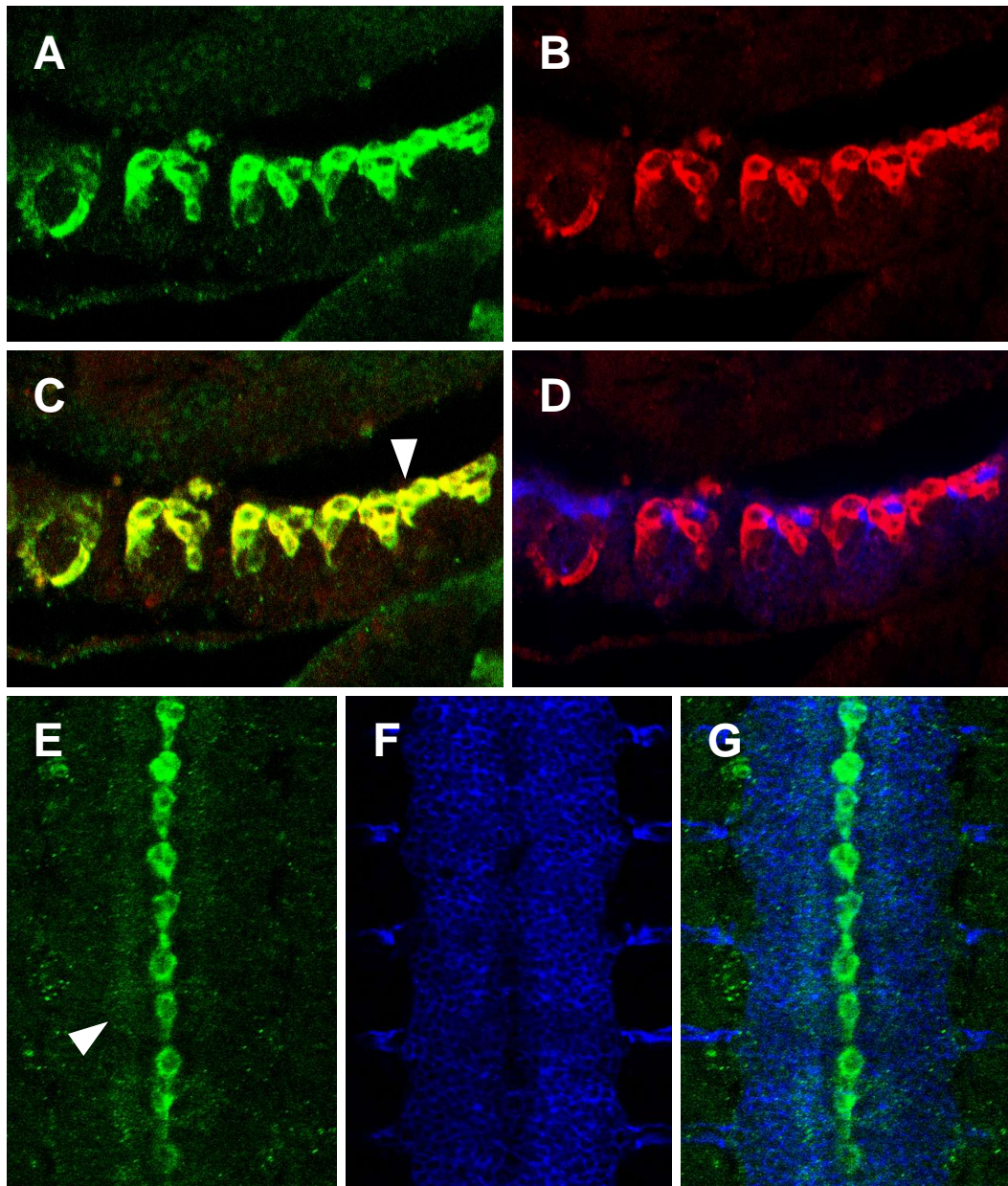


**Abb. 34 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; ventrale Ansicht; anterior ist oben; Fokussierung auf das embryonale ZNS. Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *slit*-Gal4. Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün), anti-Slit (rot) und anti-HRP (blau). (C) Überlagerung des MYC- und Slit-Signals (gelb); (D-F) Überlagerungen mit anti-HRP. In der ZNS-Mittellinie findet sich eine deutliche (A) MYC- und (B) Slit-Expression die eindeutig kolokalisiert ist (C). Neben der Expression in Mittellinienzellen findet sich keine weitere Expression von Slit-MYC.



**Abb. 35 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**

Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; anterior ist links; laterale Ansicht; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *slit-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-Slit (rot), anti-MYC (Pab c-myc, grün) und anti-HRP (blau). (E/F) Überlagerung des MYC- und Slit-Signals (gelb); (I/J) Überlagerungen des Slit-Signals mit anti-HRP (violett). (A/C/E) Die laterale Ansicht des ZNS zeigt, daß sich die Slit-MYC-Expression auf Mittellinienzellen beschränkt. (E) Zudem zeigt sich eine Kolokalisation des MYC- und Slit-Signals. (B/D/F) In einer Fokussierung auf laterale Bereiche des ZNS ist lediglich eine schwache Expression zu erkennen. Eine schematische Darstellung der Schnittebenen findet sich in Abb.31; Abb. 31G für (A/C/E/G/I) und Abb.31H für (B/D/F/H/J).



**Abb. 36 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; Fokussierung auf das ventrale ZNS; (A-D) laterale Ansicht, anterior ist links; (E-G) ventrale Ansicht, anterior ist oben. Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC mittels *slit-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-Slit (rot), anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-HRP (blau). (C) Überlagerung des MYC und Slit Signals (gelb); (D/F) Überlagerungen mit anti-HRP. Auch in frühen Entwicklungsstadien findet sich nach ektopischer Expression von Slit-MYC mittels *slit-Gal4* eine deutliche Expression der Signale in der ZNS-Mittellinie. (A-C) In der lateralen Ansicht ist eine Kolokalisation von MYC und Slit in den Mittelliniengliazellen zu erkennen (C, Pfeilkopf). (E) Die ventrale Aufsicht des ZNS zeigt eine schwache laterale MYC Expression in frühen Entwicklungsstadien (Pfeilkopf).

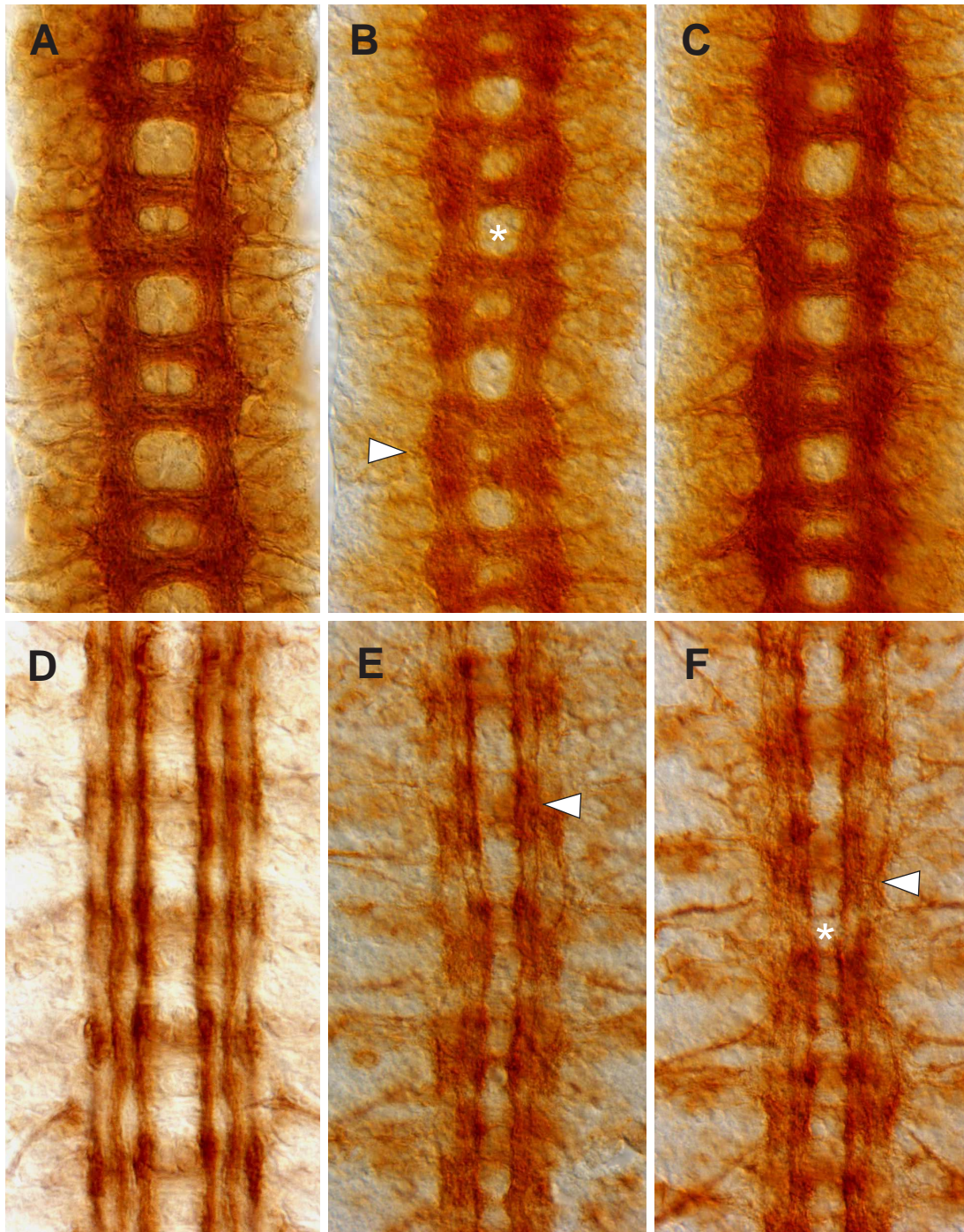
erscheint im Vergleich zum Wildtyp schmaler und die medialen Faszikel liegen sehr nah an der Mittellinie (Abb. 37F, Stern). Zudem ist die Organisation der Axontrakte gestört. So lassen sich in einigen Neuromeren die medialen und intermedialen Axontrakte nicht mehr voneinander trennen und die beiden Faszikel erscheinen fusioniert (Abb. 37E, Pfeilkopf). Auch die lateralen Axontrakte verlaufen in untypischen Bahnen und liegen teilweise näher zur Mittellinie (Abb. 37F, Pfeilkopf).

Auch nach einer ektopischen Expression mittels *da*-Gal4 sind Defekte in der Entwicklung des embryonalen ZNS zu beobachten (Abb. 38). Eine konfokale Analyse zeigt die Defekte nach der ektopischen Expression. Dabei findet sich eine SLIT-MYC Expression auf den Axonen des ZNS (Abb. 38C, Pfeilkopf). Diese resultiert in einem deutlichen ZNS-Phänotyp. In anti-HRP-Färbungen ist eine Fusion einiger Kommissuren zu beobachten (Abb. 38A, Pfeilkopf). Eine Färbung mit anti-FASII zeigt, daß hier das ZNS ebenfalls schmaler ist und die longitudinalen Faszikel näher zur ZNS-Mittellinie liegen (Abb. 38B, Stern). Allerdings fällt der beobachtete Phänotyp im Vergleich zur ektopischen Expression mittels *rho*-Gal4 schwächer aus. Der Phänotyp macht sich nicht in allen Neuromeren bemerkbar und viele Neuromere zeigen ein wildtypisches Axonmuster. Zudem zeigt sich in anti-FASII-Färbungen, daß keine Desorganisation der longitudinalen Faszikel zu beobachten ist (Abb. 38E/F). Der Abstand der Faszikel zueinander ist regelmäßig und es ist lediglich eine Verschiebung der Axontrakte in Richtung ZNS-Mittellinie in einigen Neuromeren zu beobachten (Abb. 38E, Stern).

Eine phänotypische Analyse nach Dosiserhöhung und einer anschließenden ektopischen Expression mittels weiterer Gal4-Treiberlinien wie z.B. *en*-Gal4 oder *e/av*-Gal4 stehen noch aus.

#### **3.3.4. Klonierung eines transmembrangebundenen *slit-myc*-Konstruktes**

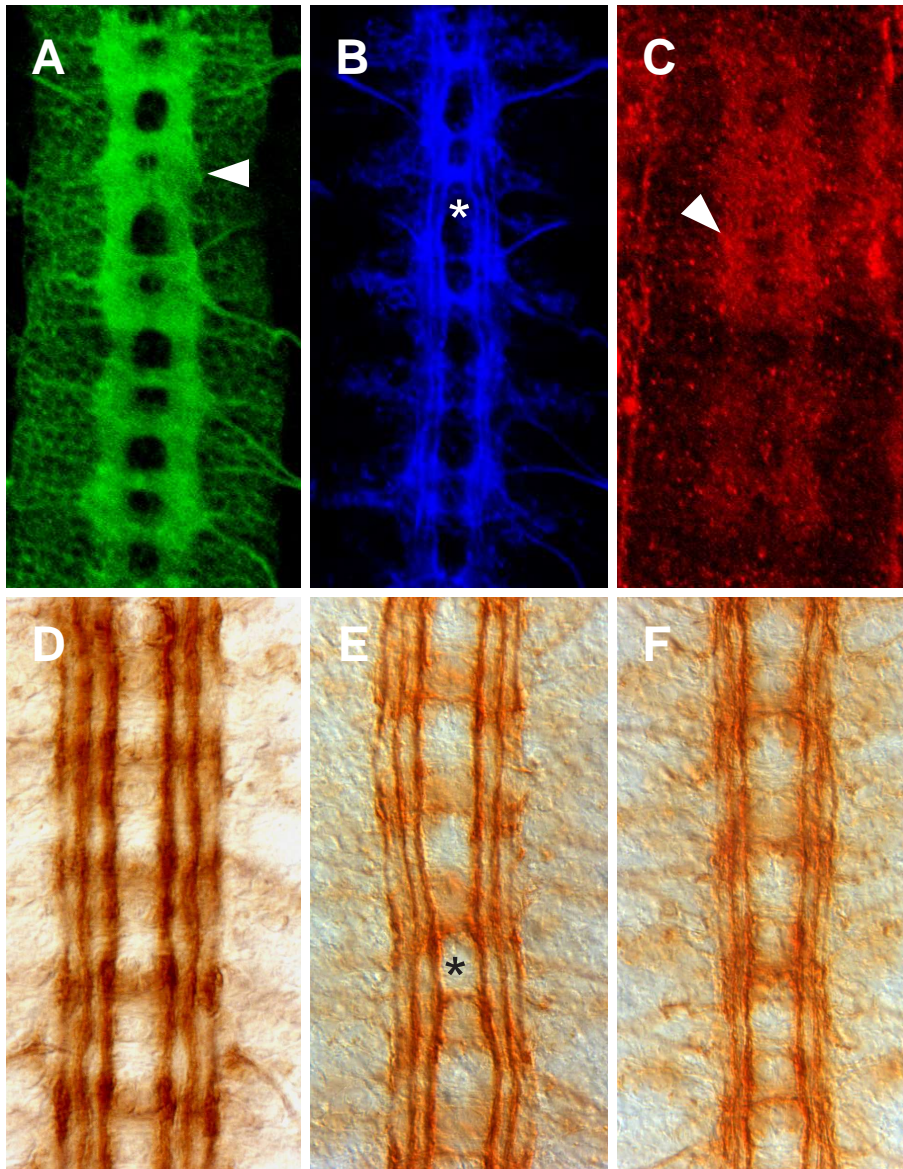
Um die Notwendigkeit einer Sezernierung von SLIT zu untersuchen wurde ein modifiziertes *slit*-Konstrukt kloniert. Neben dem N-terminalen MYC-Tag wurde zusätzlich eine Transmembrandomäne ans C-terminale Ende von *slit-myc* angehängt. Durch diese Modifizierung sollte das SLIT-Protein nach ektopischer Expression membrangebunden bleiben. Das klonierte SLIT-MYC-TM-Konstrukt wurde in den pUAST-Vektor kloniert und in Zellkultur und in der Fliege ektopisch exprimiert. So konnte die Auswirkung eines membrangebundenen SLIT-MYC untersucht werden.



**Abb. 37 Defekte in der Organisation des ZNS nach ectopischer UAS-Slit-MYC Expression im *rhomboid* Muster**

Präparation des ventralen ZNS im Stadium 16; anterior ist oben; Antikörperfärbungen mit (A-C) MAb BP102 und (D-F) anti-FasII; (A/D) ZNS im Wildtyp. Nach ectopischer Expression von UAS-Slit-MYC im *rho*-Gal4 Muster sind Defekte in der Entwicklung des ZNS zu beobachten. (B/C) Die Kommissuren sind verdickt, bzw. leicht fusioniert (B Pfeilkopf); die Konnektive liegen näher zur ZNS-Mittellinie und das ganze ZNS erscheint im Vergleich zum Wildtyp schmaler (B, Stern). (E/F) Auch mit anti-FasII ist zu erkennen, daß die longitudinalen Axontrakte näher zur ZNS-Mittellinie liegen (F, Stern). Zudem ist der Abstand der intermedialen und medialen Faszikel zueinander deutlich geringer als im Wildtyp (E, Pfeilkopf). Auch die lateralen Faszikel liegen in einigen Neuromeren näher zur Mittellinie (F, Pfeilkopf).





**Abb. 38 Defekte in der Organisation des ZNS nach ectopischer UAS-Slit-MYC-Expression im *daughterless* Muster**

(A-C) Konfokale Analyse am *whole mount*; Fokussierung auf das ventrale ZNS, anterior ist oben; (D-F) Präparation des ventralen ZNS im Stadium 16, anterior ist oben; Antikörperfärbungen mit (A-C) anti-HRP (grün), anti-FasII (blau) und anti-MYC (PAb c-myc, rot); (D-F) Antikörperfärbungen mit anti-FasII; (D) ZNS im Wildtyp. Nach ectopischer Expression von UAS-Slit-MYC im *da-Gal4* Muster sind Defekte in der Entwicklung des ZNS zu beobachten. (A) Die Commissuren sind verdickt, bzw. leicht fusioniert (Pfeilkopf); (B/E/F) mit anti-FasII ist zu erkennen, daß die longitudinalen Axontrakte näher zur Mittellinie liegen (B/E, Stern); zudem erscheint das ZNS schmaler. (C) Die konfokale Analyse zeigt die Expression von Slit-MYC im ZNS (Pfeilkopf).

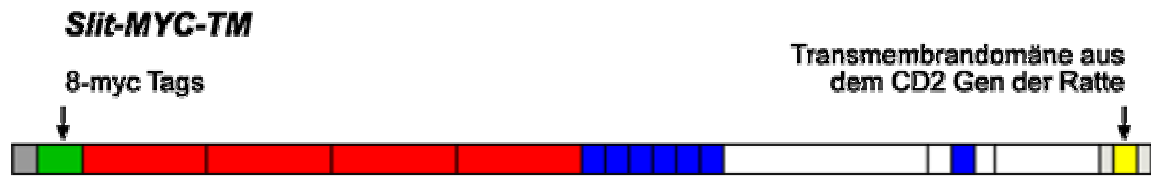


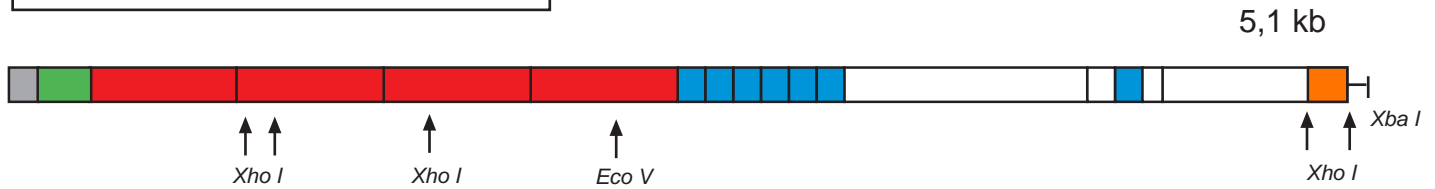
Abb. 39 Schematische Darstellung des klonierten *slit-myc-TM*-Konstruktes

### 3.3.4.1. Klonierungsstrategie

Ausgehend von der *slit-myc*-DNA (siehe 1.3.3.1) wurde über molekularbiologische Methoden eine Transmembrandomäne aus der Ratten *CD2*-cDNA (Dunin-Borkowski and Brown, 1995) eingefügt. Abb. 40 gibt schematisch die wichtigsten Schritte der Klonierung wieder.

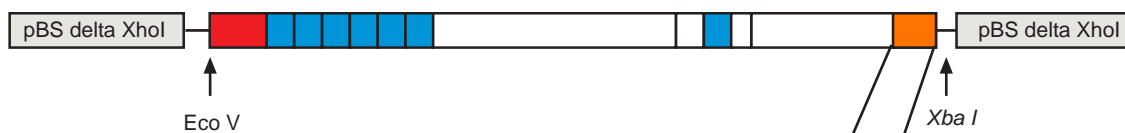
Als "Vehikel" für die Klonierung des *slit-myc-TM*-Konstruktes wurde zunächst eine verkürzte *slit*-DNA kloniert. Es wurde ein C-terminales Fragment der *slit-myc*-cDNA über *EcoV* und *XbaI* in einen zuvor modifizierten Bluescript-Vektor (pBS) kloniert. Der modifizierte pBS-Vektor weist in seiner Klonierungsregion keine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle mehr auf. So konnte ein C-terminales *XhoI*-Fragment der verkürzten *slit*-DNA gegen ein *XhoI*-Fragment mit der Transmembrandomäne ausgetauscht werden. Ein entsprechendes Transmembran-*XhoI*-Fragment wurde mittels PCR aus der *CD2*-cDNA herausamplifiziert, wobei am 3'- und 5'-Ende artifizielle *XhoI*-Schnittstellen im PCR-Produkt generiert wurden. Desweiteren wurde der 3'-Primer dahingehend modifiziert, daß dieser vor der *XhoI*-Schnittstelle ein Stop-Codon trägt. So wird bei der Translation von SLIT-MYC-TM gewährleistet, daß der Kettenabbruch in unmittelbarer Nähe der eingefügten Transmembrandomäne erfolgt. Nach erfolgreicher Klonierung der Transmembrandomäne in die verkürzte *slit*-DNA wurde das C-terminale Fragment über *EcoV* und *XbaI* zurück in die verkürzte *slit-myc*-DNA kloniert. Das vollständige *slit-myc-TM*-Konstrukt wurde anschließend in den pUAST-Vektor kloniert.

## Ausgangsprodukt: *slit-myc*



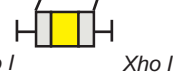
## Klonierungsstrategie zur Klonierung von UAS-*slit-myc-TM*

### 1. Subklonierung eines verkürzten *slit*-Fragmentes

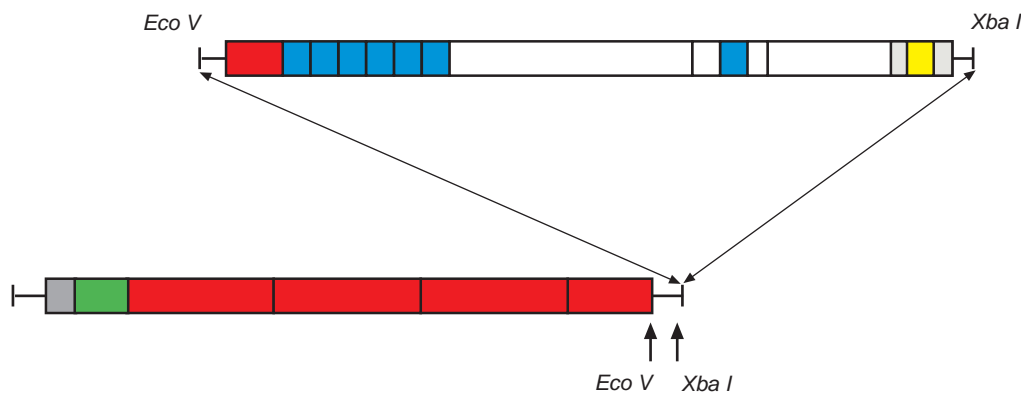


### 2. Amplifikation der Transmembrandomäne

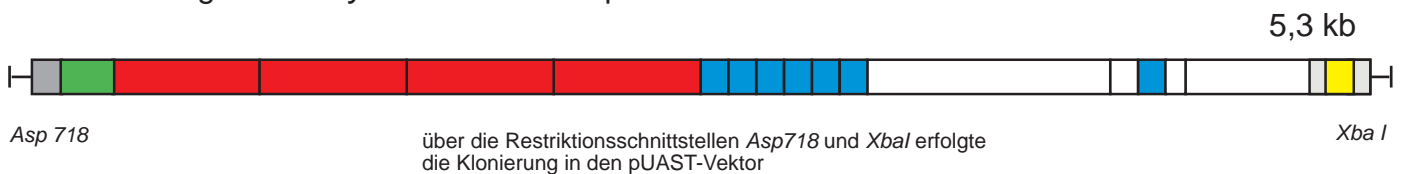
Transmembrandomäne aus dem CD2 Gen



### 3. Vervollständigung der *slit-myc-TM* DNA



### 4. Klonierung der *slit-myc-TM* DNA in den pUAST-Vektor



**Abb. 40 Schematische Darstellung der Klonierung des UAS-*slit-myc-TM*-Konstruktes**  
Zur Klonierung des *slit-myc-TM*-Konstrukt wurde in die *slit-myc*-DNA eine Transmembrandomäne aus dem *CD2*-Gen der Ratte eingefügt (Dunin-Borkowski et. al, 1995). Das vollständig klonierte *slit-myc-TM*-Konstrukt wurde anschließend in den pUAST-Vektor kloniert.

### **3.3.4.2. Expression von SLIT-MYC-TM in *Drosophila* S2-Zellen**

Um das klonierte SLIT-MYC-TM-Konstrukt zu testen, wurde dieses ebenfalls in *Drosophila* S2-Zellen exprimiert. Nach ektoptischer Expression wurde an fixierten S2-Zellen eine Antikörperfärbung mit anti-MYC (MAb 9E10) und anti-SLIT durchgeführt. Die Antikörperfärbungen zeigen eine deutliche Expression von MYC (Abb. 41A) und SLIT (Abb. 41C). Dabei ist eine Kolokalisation beider Signale zu beobachten (Abb. 41E). Diese Kolokalisation läßt sich insbesondere an der Membran der Zellen feststellen (Abb. 41E, Pfeilkopf). Bei einer Betrachtung der subzellulären Verteilung des ektoptischen Proteins zeigt sich hauptsächlich an der Membran eine deutliche Expression, die zudem punktiert auftritt (Abb. 41A, Pfeilkopf). Im Cytoplasma der Zelle ist lediglich eine schwache Expression (Abb. 41C, Pfeilkopf) zu erkennen. Zudem ist eine Expression um den Zellkern herum zu beobachten. Die SLIT-Expression um den Zellkern ist dabei deutlich stärker als die MYC-Expression (Abb. 41E Stern). Zusätzlich wurden die Zellgrenzen durch eine Phalloidin-Färbung visualisiert. Dabei ist keinerlei Expression von SLIT-MYC-TM außerhalb der Zellen zu beobachten. Allerdings ist anhand der Phalloidin-Färbung zu erkennen, daß die ektoptische Expression von SLIT-MYC-TM zu einer morphologischen Veränderung der Zellen führt. Diese kollabieren nach ektoptischer SLIT-MYC-TM-Expression.

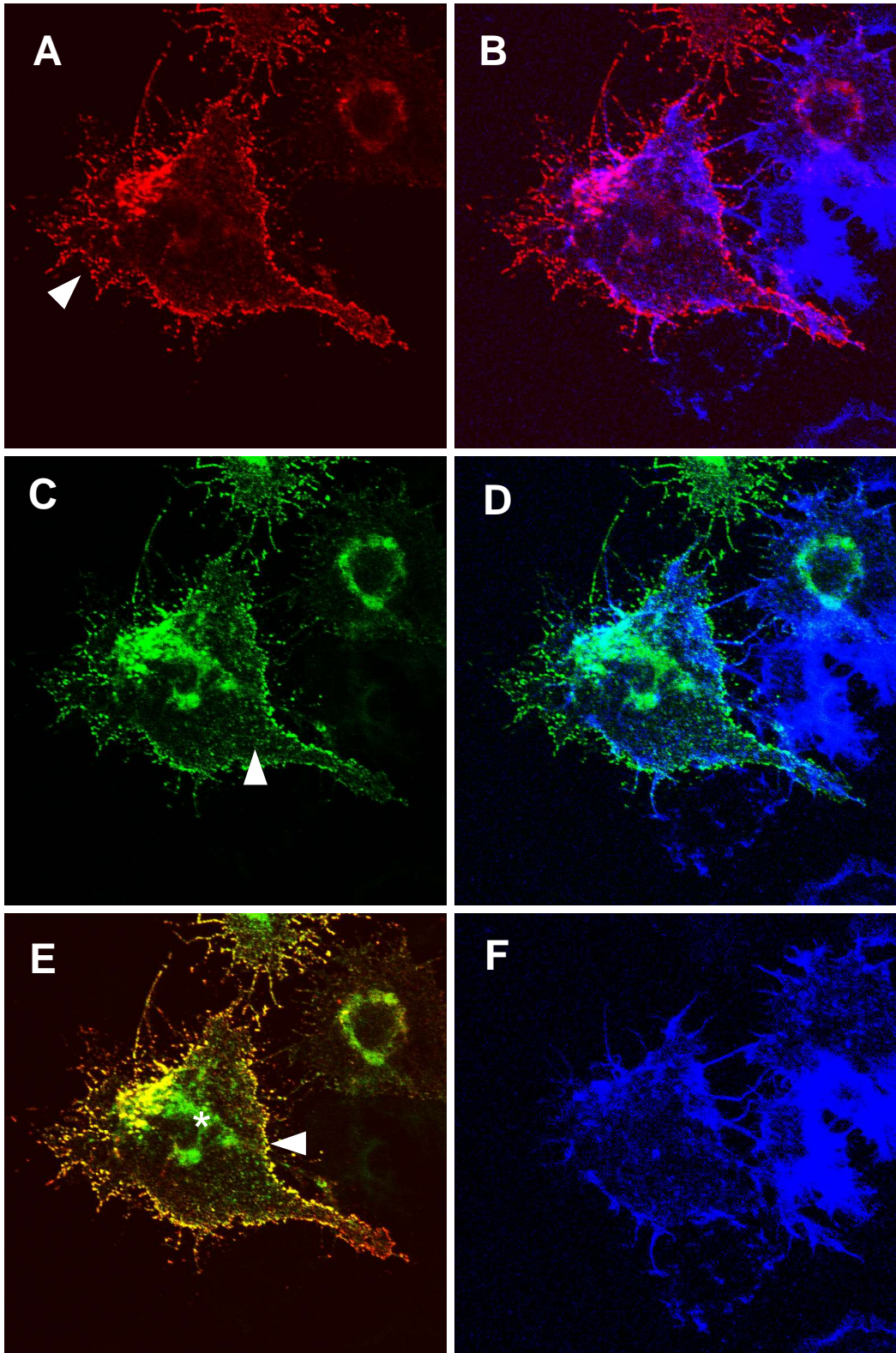
### **3.3.4.3. Etablierung transgener UAS-*slit-myc-TM* Fliegen**

Auch für das *slit-myc-TM*-Konstrukt wurde eine Keimbahntransformation durchgeführt. So kann die Auswirkung einer ektoptischen SLIT-MYC-TM-Expression in *Drosophila* studiert und mit den gewonnenen Erkenntnissen nach ektoptischer SLIT-MYC-Expression verglichen werden.

Nach erfolgter Keimbahntransformation konnten sieben transgene UAS-*slit-myc-TM* Insertionslinien etabliert werden. Dabei fanden sich eine Insertionen auf dem X Chromosom, zwei Insertionen auf dem 2. Chromosom sowie vier Insertionen auf dem 3. Chromosom.

### **3.3.4.4. Ektoptische Expression von UAS-*slit-myc-TM***

Die erhaltenen transgenen UAS-*slit-myc-TM* Stämme wurden zunächst auf ihre Expression hin untersucht. Dabei wurde getestet ob nach ektoptischer Expression mit



**Abb. 41 Expression von UAS-Slit-MYC-TM in *Drosophila* S2-Zellen**

Antikörperfärbung an *Drosophila* S2-Zellen nach erfolgter UAS-Slit-MYC-TM-Expression; Antikörperfärbung mit anti-Slit (grün) und anti-MYC (c-myc; rot); Visualisierung des Aktin-Cytoskeletts durch Phalloidin (blau). (A/C/E) Die ektopische Expression von Slit-MYC-TM ist hauptsächlich an der Membran der Zellen lokalisiert (E, Pfeilkopf); dort findet sich eine Kolokalisation beider Signale (E, Überlagerung, gelb); zudem tritt die Expression an der Membran punktiert auf. Außerdem findet sich eine Expression um den Zellkern (E, Stern) sowie eine schwache cytoplasmatische Expression (C, Pfeilkopf).

Hilfe unterschiedlicher Gal4-Treiberlinien im *Drosophila* Embryo eine ektopische SLIT- und MYC-Expression zu erkennen ist. Anschließend wurde in Rettungsexperimenten die Funktionalität des Konstruktes getestet. Desweiteren wurde analysiert ob eine neuronale ektopische Expression zu Defekten in der ZNS-Entwicklung führt. Abschliessend wurde die Verteilung der Expression von SLIT-MYC-TM im Embryo untersucht .

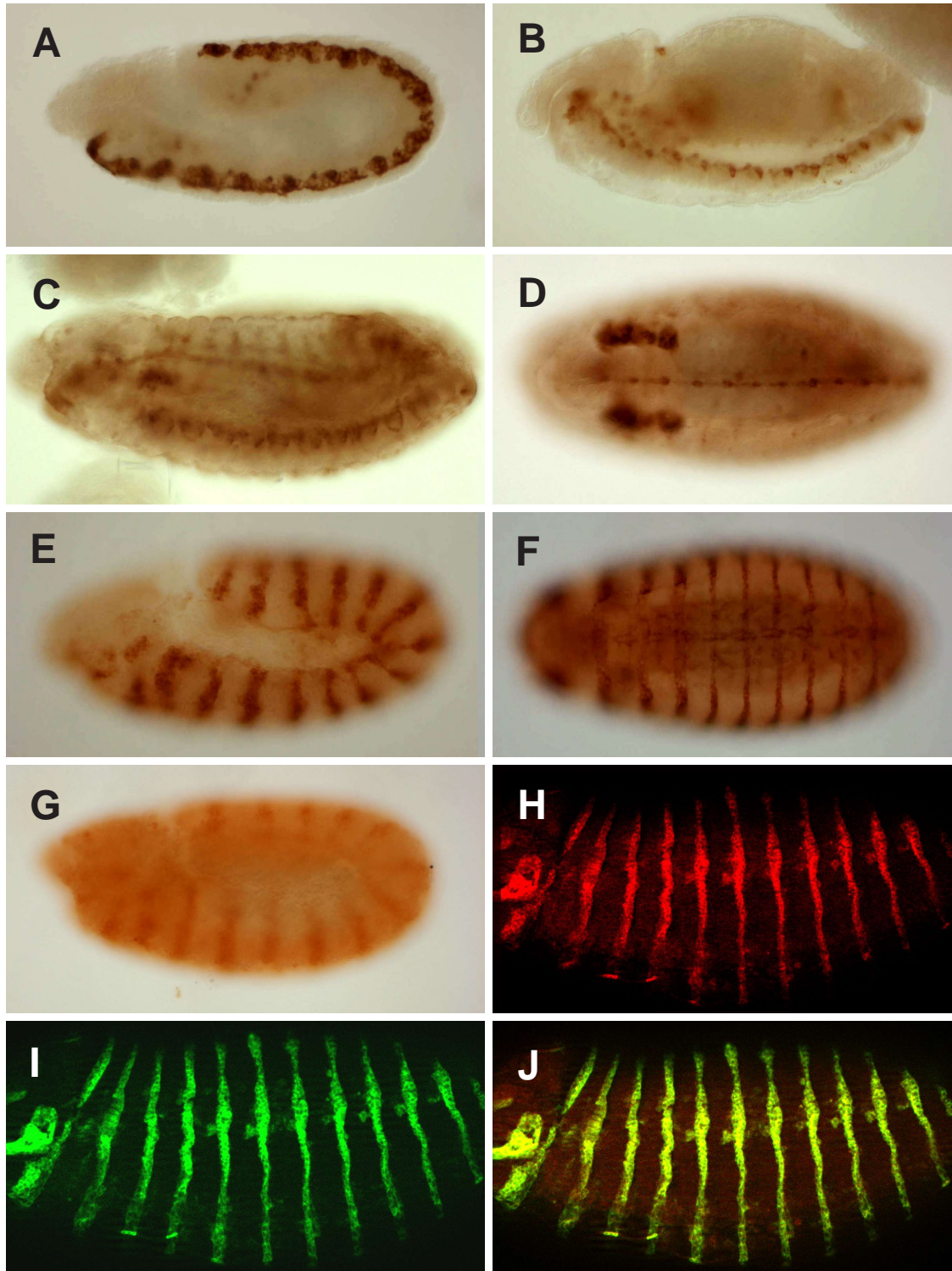
#### **3.3.4.4.1. Test der UAS-*slit-myc-TM* Stämme**

Um eine erfolgreiche Keimbahntransformation des SLIT-MYC-TM-Konstruktes zu kontrollieren, wurden verschiedene transgene UAS-*slit-myc-TM* Stämme gegen unterschiedliche Gal4-Treiberlinien getestet. Dabei wurden die Gal4-Treiberlinien *en-Gal4*, *rho-Gal4* und *sim-Gal4* verwendet. Nach ektopischer Expression wurden Embryonen gesammelt und in Antikörperfärbungen auf eine SLIT-, bzw. MYC-Expression getestet.

Abb. 42 zeigt exemplarisch einige anti-MYC-, bzw. anti-SLIT-Färbungen nach ektopischer SLIT-MYC-TM-Expression. Alle Embryonen zeigen eine deutliche ektopische Expression im Muster des verwendeten Gal4-Stammes. So findet sich eine MYC-Expression im Muster der Gal4-Treiberlinien *sim-Gal4* (Abb. 42A/B), *rho-Gal4* (Abb. 42C/D) und *en-Gal4* (Abb. 42E/F). Neben einer ektopischen MYC-Expression ist auch die ektopische Expression von SLIT nachweisbar. Abb. 42G zeigt eine SLIT-Expression im *engrailed*-Muster. Allerdings ist auch hier die anti-SLIT-Färbung im Vergleich zu anti-MYC wesentlich schwächer. Um die Koexpression der beiden Marker zu zeigen, wurde daher zudem eine konfokale Analyse der ektopischen Expression im Muster von *en-Gal4* durchgeführt. Die konfokale Analyse zeigt eine Kolokalisation von SLIT und MYC nach ektopischer Expression (Abb. 42J). Beide Signale kolokalisieren in den typischen segmentalen *engrailed*-Streifen.

#### **3.3.4.4.2. Rettung des mutanten Phänotyps durch SLIT-MYC-TM**

Um die biologische Funktionalität des SLIT-MYC-TM-Konstruktes zu testen, wurden Rettungsexperimente durchgeführt. Dabei wurde analysiert ob die ektopische Expression von SLIT-MYC-TM zu einer Rettung des mutanten *slit*<sup>B1-32</sup> Phänotyps führt.



**Abb. 42 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM**

Whole mount Präparate; anterior ist links; (A-C/E/G-J) ventral ist unten; (D/F) ventrale Ansicht; Nach ektopischer Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels verschiedener Gal4-Treiberlinien wurde eine Antikörperfärbung mit MA b 9E10 (anti-MYC; A-F) oder anti-Slit (G/H) durchgeführt; (A/B) Ektopische Expression im *single minded*-Muster (*sim*-Gal4); (C/D) MYC-Expression im Muster des *rho*-Gal4 Treibers; (E/F) *en*-Gal4 getriebene MYC-Expression; (G) Expression von Slit im *engrailed*-Muster (*en*-Gal4); (H-J) ektopische Expression von Slit-MYC-TM mittels *en*-Gal4 und anschließende konfokale Analyse. Eine Antikörperfärbung mit anti-Slit (H) und anti-MYC (PAb c-myc, I) zeigt eine Kolokalisation der beiden Marker (gelb, J).

Hierfür wurden die unter 3.3.3.4.2 beschriebenen Rekombinanten benutzt und auf das dritte Chromosom eine SLIT-MYC-TM-Insertion gekreuzt.

So wurden die folgenden Stämme etabliert:

- *slit*<sup>B1-32</sup>; *sim-Gal4* / *Cyo*<sup>bb</sup>, UAS-*slit-myc-TM* / UAS-*slit-myc-TM*
- *slit*<sup>B1-32</sup>; *slit-Gal4* / *Cyo*<sup>bb</sup>, UAS-*slit-myc-TM* / UAS-*slit-myc-TM*

In den Nachkommen dieser Stämme ist ein Viertel aller Embryonen homozygot mutant für die Mutation *slit*<sup>B1-32</sup>, sowie homozygot für die Gal4-Linie und die SLIT-MYC-TM Insertion. Diese Embryonen können über die Verwendung eines "blauen Balancers" eindeutig identifiziert werden.

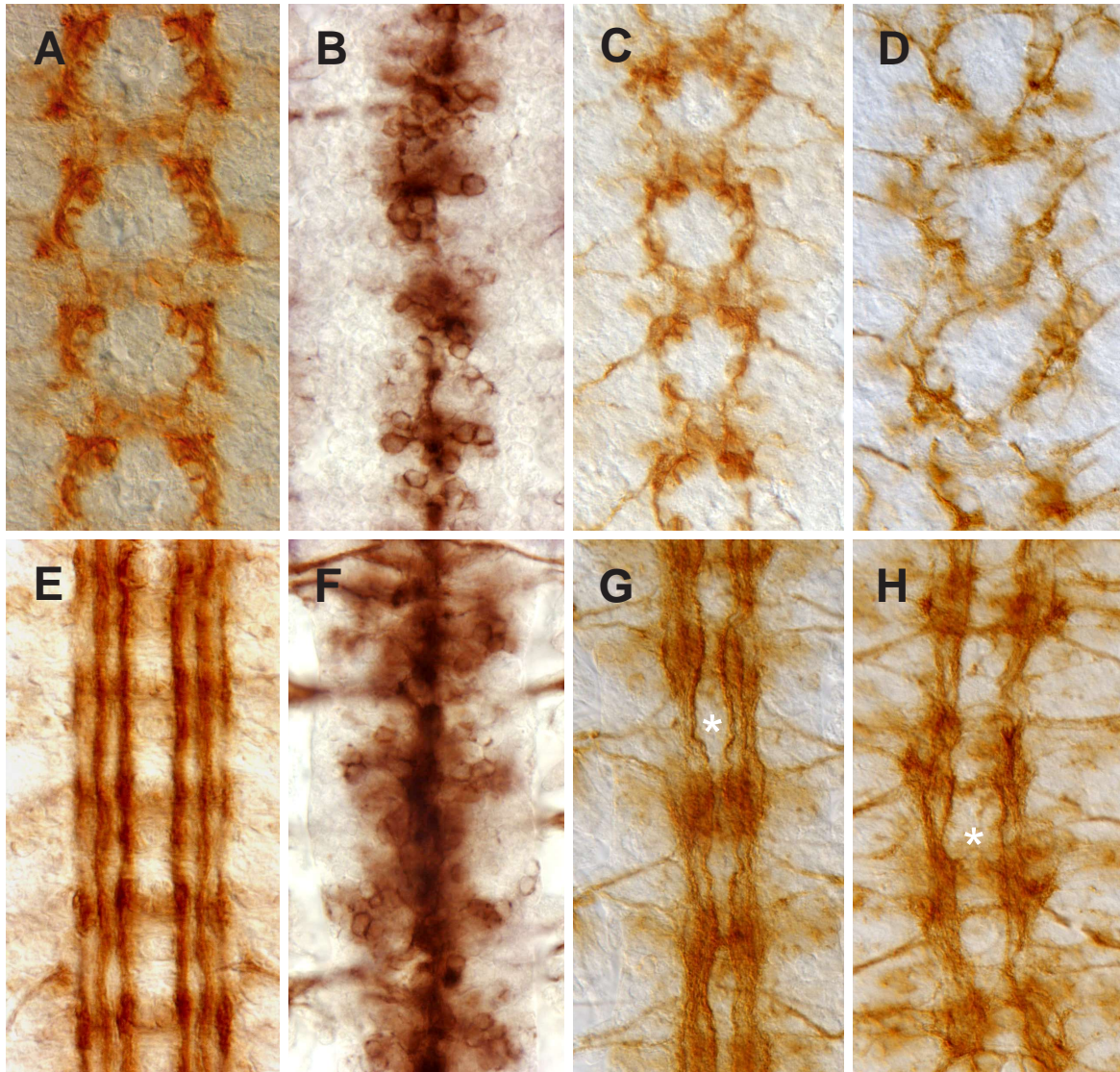
Die ektopische Expression von UAS-*slit-myc-TM* im *sim-Gal4* und *slit-Gal4* Muster, im homozygot mutanten *slit*<sup>B1-32</sup> Hintergrund, führt ebenfalls zu einer partiellen Rettung des *slit*<sup>B1-32</sup> Ausfall-Phänotyps. Nach einer ektopischen Expression ist in anti-FASII Färbungen eine Trennung der longitudinalen Axontrakte an der Mittellinie zu erkennen (Abb. 26C/F). Zwar sind die Faszikel weiterhin unorganisiert, eine axonale Repulsion an der Mittellinie ist allerdings wieder zu beobachten (Abb. 26G/H, Stern). Der Vergleich mit der SLIT-MYC Rettung zeigt, daß beide SLIT-Konstrukte den Ausfallphänotyp der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> retten können. Deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Rettung sind nicht zu beobachten.

#### **3.3.4.4.3. Verteilung ektopischer SLIT-MYC-TM- Expression**

Auch für SLIT-MYC-TM wurde die Verteilung nach ektopischer Expression in unterschiedlichen Geweben genauer betrachtet. Es wurden unterschiedliche UAS-*slit-myc-TM* Insertionen gegen einige Gal4-Treiberlinien gekreuzt, die Embryonen wurden gesammelt und in Antikörperfärbungen auf eine SLIT-, bzw. MYC-Expression getestet.

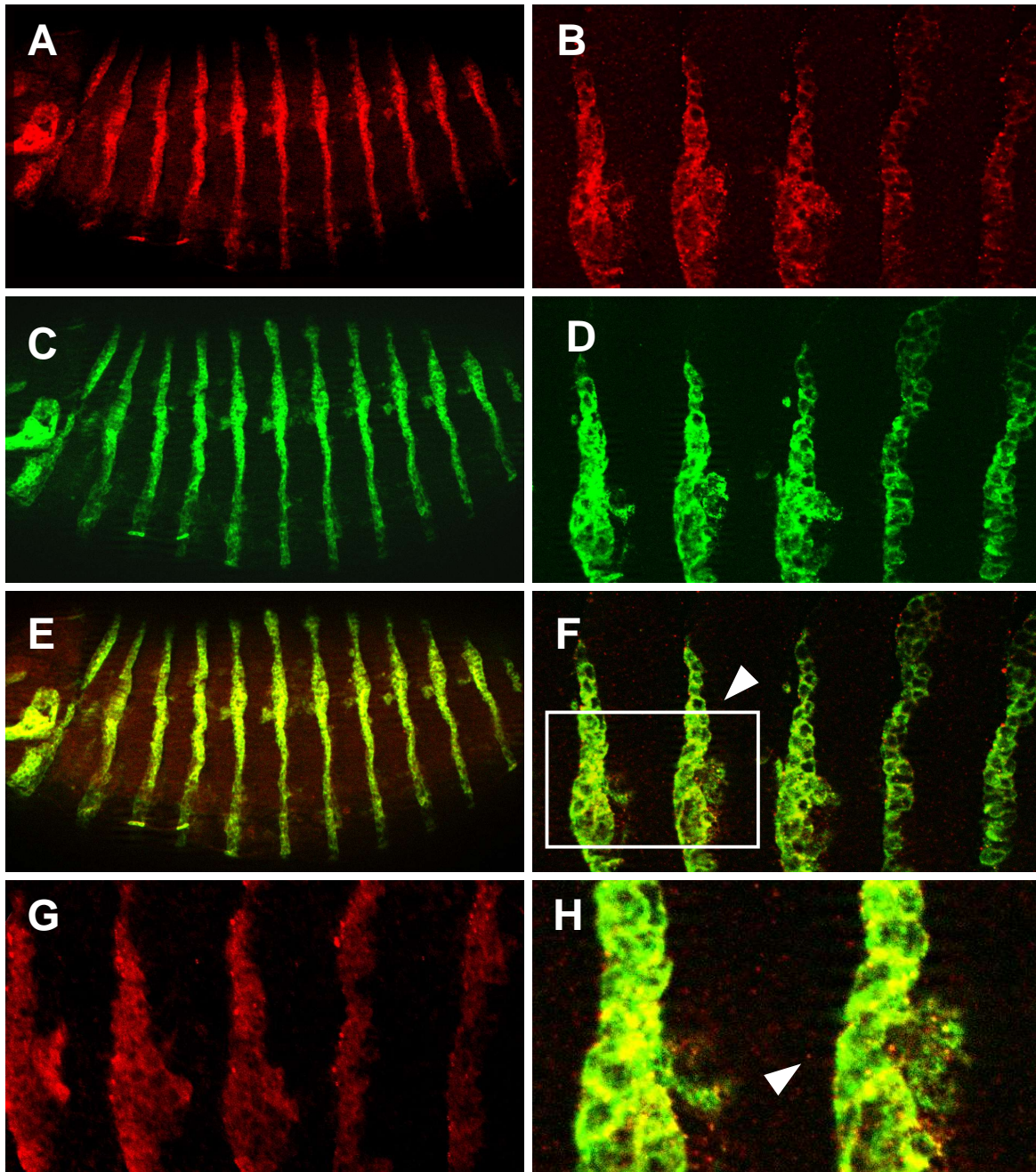
Zunächst wurde die ektopische Expression im *en-Gal4*-Muster analysiert (Abb. 44). Die konfokale Analyse zeigt eine Kolokalisation der SLIT- und MYC-Expression im Muster von *en-Gal4* (Abb. 40E/F). Eine genaue Betrachtung der Expression zeigt, daß sich diese auf die Expressionsdomäne von *en-Gal4* beschränkt. Außerhalb der Domäne ist keine ektopische Expression von SLIT-MYC-TM nachweisbar (Abb. 44H). Lediglich eine schwache SLIT-Hintergrundfärbung ist in einer Vergrößerung zu erkennen (Abb. 44H).





**Abb. 43 Rettung des ZNS Phänotyps der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> nach ektopischer Slit-MYC-TM Expression**

Präparation des ventralen ZNS in verschiedenen Entwicklungsstadien; Antikörperfärbungen mit anti-FasII; anterior ist oben; (A/E) ZNS im Wildtyp; (B/F) *slit* Nullmutation *slit*<sup>B1-32</sup>. Ektopische Expression von Slit-MYC-TM im (C/G) *sim*-Gal4 Muster und (D/H) *slit*-Gal Muster, im Hintergrund der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup>. (A-D) Stadium 12, (E-F) Stadium 16. Die Antikörperfärbungen zeigen das der ZNS Phänotyp der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> durch eine ektopische Slit-MYC-TM Expression in der ZNS-Mittellinie partiell gerettet werden kann. Nach ektopischer Expression ist eine Trennung der Faszikel in der ZNS-Mittellinie zu beobachten (G, Stern). Allerdings sind die longitudinalen Axontrakte weiterhin desorganisiert.



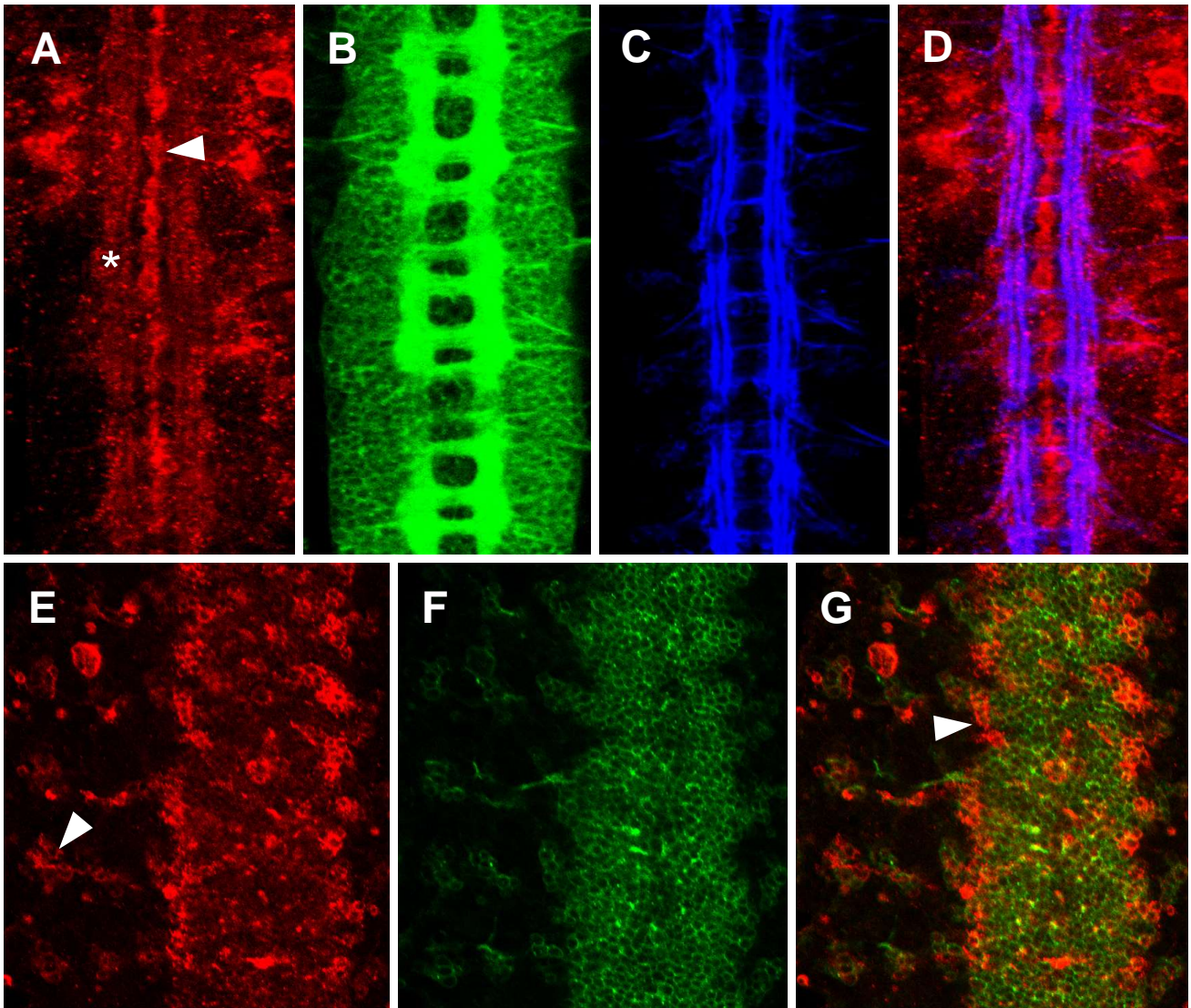
**Abb. 44 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; anterior ist links, ventral ist unten; laterale Ansicht; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels *en-Gal4*. (A/B) Antikörperfärbung mit anti-Slit und (C/D) anti-MYC (PAb c-myc, grün); (E-H) Überlagerung der beiden Signale (gelb). (A/C/E) In der Übersicht des Embryo ist eine Kolokalisation des Slit- und MYC-Signals zu erkennen; (B/D/F) Die Vergrößerung der lateralen Ansicht zeigt, daß sich die Expression auf die wildtypische *engrailed*-Expressionsdomäne beschränkt (F, Pfeil). (H) Lediglich eine schwache Slit-Hintergrundfärbung ist außerhalb der *en-Gal4*-Domäne zu erkennen (H Pfeil); (F) Kasten markiert den in (H) vergrößerten Bereich. (G) *en-Gal4* Expressionsdomäne, visualisiert mittels UAS-lacZ; Antikörperfärbung mit anti-βGal.

Anschließend wurde die ektopische Verteilung nach einer panneuralen Expression analysiert. Hierzu wurden die Gal4-Treiberlinien *elav-Gal4* und *rho-Gal4* verwendet. Nach einer Expression mittels *rho-Gal4* findet sich eine Expression in Zellen der Mittellinie (Abb. 45A, Pfeilkopf) sowie auf Axonbahnen des ZNS (Abb. 45A Stern). Die anti-HRP und anti-FasII Färbungen zeigen zudem, daß eine Expression im *rho-Gal4*-Muster zu keinem abnormen ZNS-Phänotyp führt. Das Axon-Muster des ZNS ist wildtypisch (Abb. 45B/C). Eine ektopische Expression mittels *elav-Gal4* resultiert in einer SLIT-MYC-TM-Expression im gesamten Neuropil (Abb. 45E, Stern). In einer Überlagerung mit dem neuronalen Marker anti-HRP ist zu erkennen, daß sich insbesondere in lateralen Bereichen des Neuropils eine starke Expression findet (Abb. 45G, Pfeilkopf). Zudem zeigt sich eine MYC-Expression im PNS (Abb. 45E, Pfeilkopf).

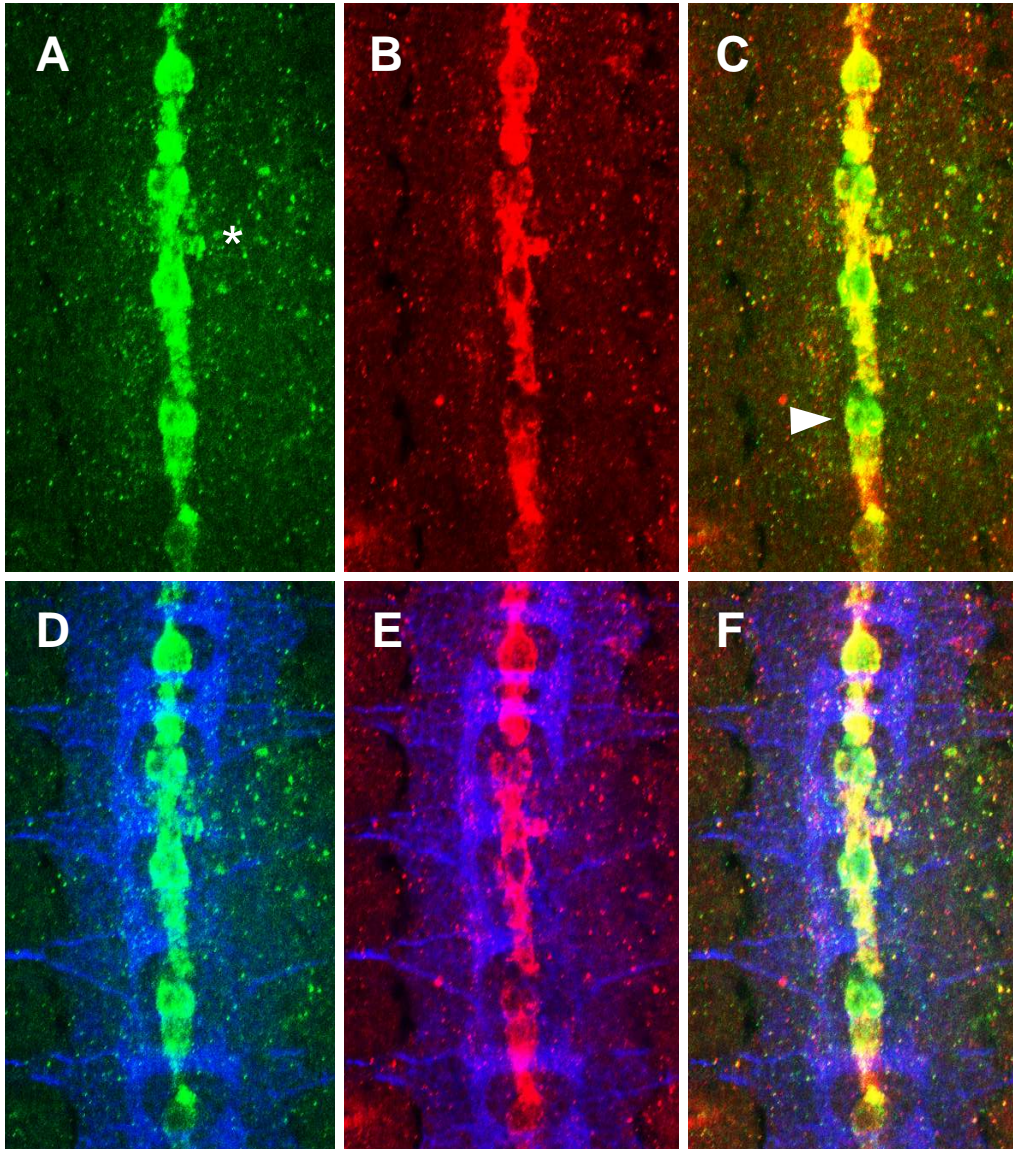
Eine ektopische Expression in der ZNS-Mittellinie wurde mit Hilfe der Gal4-Treiberlinie *sim-Gal4* durchgeführt. In der konfokalen Analyse nach ektopischer Expression im *sim-Gal4* Muster zeigt sich eine SLIT-MYC-TM-Expression in Mittellinienzellen (Abb. 46). Dabei ist eine Kolo-kalisation des SLIT- und des MYC-Signals zu beobachten (Abb. 46C). Zudem weist die Überlagerung der beiden Signale darauf hin, daß die MYC-Expression in einigen Zellen stärker ist (Abb. 46C Pfeilkopf). Neben der Expression in der ZNS-Mittellinie ist eine schwache MYC- und SLIT-Expression lateral der Mittellinie zu erkennen (Abb. 46A Stern). Im Vergleich mit der Expression von SLIT-MYC im *sim-Gal4*-Muster (1.3.3.4.3, Abb. 30) fällt diese Expression allerdings deutlich schwächer aus.

Eine laterale Ansicht eines Embryo nach ektopischer SLIT-MYC-TM-Expression mittels *sim-Gal4* zeigt ebenfalls die Expression in der Mittellinie (Abb. 47). In einer Fokussierung auf die ZNS-Mittellinie ist in der lateralen Ansicht zu erkennen, daß eine SLIT Expression nicht mit dem anti-HRP-Signal überlappt. Lediglich in der Fokussierung auf laterale Bereiche des ZNS ist eine Kolo-kalisation der SLIT-Expression und dem HRP-Signal zu erkennen (Abb. 47F, Pfeilkopf). Im Vergleich mit der SLIT-MYC-Expression (1.3.3.4.3, Abb. 31) fällt diese laterale Expression ebenfalls deutlich schwächer aus.

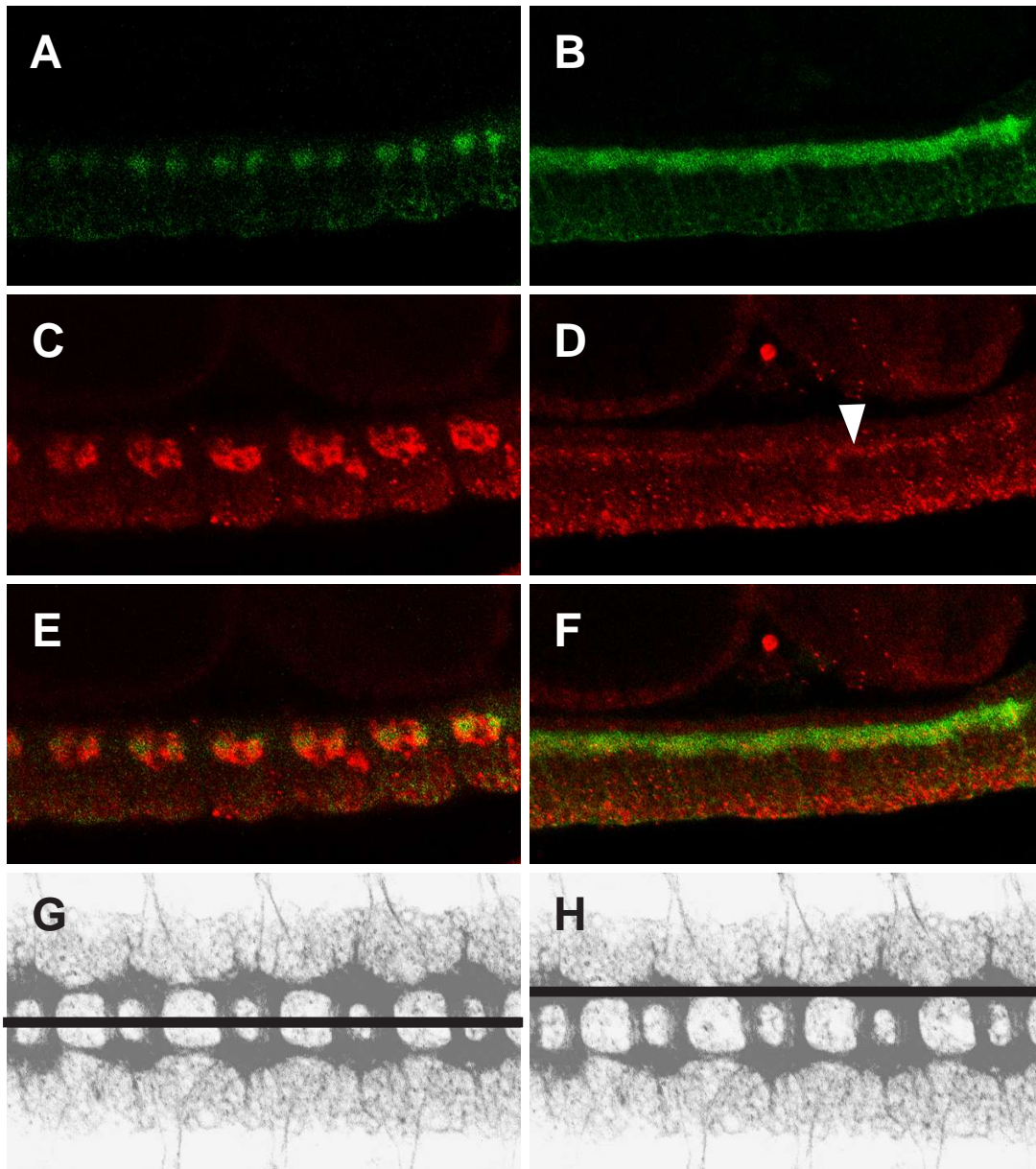
Eine Analyse der Verteilung von SLIT-MYC-TM nach ektopischer Expression mittels *slit-Gal4* konnte nicht vollendet werden. Weitere Analysen stehen somit noch aus.



**Abb. 45 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Analyse am *whole mount*; anterior ist oben; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels (A-C) *rho*-Gal4 und (D-F) *elav*-Gal4. Antikörperfärbung mit anti-MYC (MAb 9E10,rot), anti-HRP (grün) und anti-FasII (blau). (A) Nach ektopischer Expression mittels *rho*-Gal4 findet sich eine MYC-Expression in der ZNS-Mittellinie (Pfeilkopf) sowie auf Axonen im ZNS (Stern); die axonale Expression zeigt eine Überlagerung mit anti-FasII (D, violett). Die Expression von Slit-MYC-TM im *rho*-Gal4 Muster führt zu keinerlei Defekten im ZNS. Das Axonmuster ist wildtypisch. (A) Eine ektopische Expression mittels *elav*-Gal4 resultiert in einer MYC-Expression im kompletten Neuropil. (C) Insbesondere in lateralen Bereichen des Neuropils findet sich eine starke MYC-Expression (Pfeilkopf); dies ist in einer Überlagerung mit anti-HRP zu erkennen (gelb). (E) Zudem findet sich eine MYC-Expression im PNS (Pfeilkopf).



**Abb. 46 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; ventrale Ansicht, anterior ist oben; Fokussierung auf das embryonale ZNS. Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels *sim-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün), anti-Slit (rot) und anti-HRP (blau). (C) Überlagerung des MYC- und Slit-Signals (gelb); (D-F) Überlagerungen mit anti-HRP. In der ZNS-Mittellinie findet sich eine deutliche (A) MYC- und (B) Slit-Expression die eindeutig kolokalisiert ist. (C) In einigen Zellen der ZNS-Mittellinie ist jedoch eine deutlich stärkere MYC-Expression zu beobachten (Pfeilkopf) Neben der Expression in Mittellinienzellen findet sich eine schwache laterale Expression (A Stern).



**Abb. 47 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM; Konfokale Analyse**  
 Konfokale Aufnahmen am *whole mount*; laterale Ansicht; anterior ist links; ventral ist unten; Fokussierung auf das embryonale ZNS; Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels *sim-Gal4*. Antikörperfärbung mit anti-HRP (grün) und anti-Slit (rot); (E/F) Überlagerung der beiden Signale (gelb); (G/H) Schematische Darstellung der Schnittebenen, (G) für (A/C/E) und (H) für (B/D/F). In der lateralen Ansicht ist nur eine schwache axonale Expression von Slit-MYC nachzuweisen. (A/C/E) Bei einer Fokussierung auf die Ebene der ZNS-Mittellinie (G), ist in der Überlagerung des Slit- und HRP-Signals zu erkennen, daß keine Slit-Expression mit einer HRP-Färbung überlappt. (B/D/F) Dagegen ist in lateralen Bereichen des ZNS, eine schwache Slit-Expression im Bereich der anti-HRP positiven Axonen zu beobachten (D, Pfeilkopf).

#### **3.3.4.4. Phänotypische Charakterisierung nach ektopischer SLIT-MYC-TM-Expression**

Die ektopische Expression von SLIT-MYC im embryonalen Nervensystem führt zu Defekten in der Entwicklung des ZNS (3.3.3.4.4). Daher wurde auch für SLIT-MYC-TM untersucht ob eine ektopische Expression im Embryo zu abnormen ZNS-Phänotypen führt. Verschiedene *UAS-slit-myc-TM* Insertionen wurden gegen unterschiedliche neuronale Gal4-Treiber gekreuzt und die Nachkommen auf Defekte in der ZNS Entwicklung hin untersucht.

Die phänotypischen Analysen nach ektopischer Expression zeigten, daß für SLIT-MYC-TM-Einzelsinsertionen keine Defekte im ZNS beobachtet werden konnten. Weder eine panneurale Expression, noch eine Expression in der ZNS-Mittellinie führten zu abnormen Phänotypen. Eine Analyse nach Dosiserhöhung durch Doppelinsertionen wurde begonnen, konnte allerdings noch nicht zum Abschluß gebracht werden.

#### **3.3.5. Vergleichende Expressionsstudien von SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM**

Aus dem Vergleich der Expression von SLIT-MYC mit transmembrangebundenem SLIT-MYC-TM sind Erkenntnisse über die Sezernierung von SLIT zu erwarten. Die genauen Analysen der SLIT-MYC- und SLIT-MYC-TM-Expression in Embryonen zeigten teilweise Unterschiede in der Verteilung (3.3.3.4.3 und 3.3.4.4.4) der ektopisch exprimierten Proteine. Ergänzend sollte nun in anderen Geweben die ektopische Expression der beiden Konstrukte eingehend analysiert werden, um diese miteinander vergleichen zu können. Dazu wurden SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM in Imaginalscheiben ektopisch exprimiert.

##### **3.3.5.1. Ektopische Expression der SLIT-Konstrukte in Flügelimaginalscheiben**

Mit Hilfe der Gal4-Treiberlinie *en-Gal4* wurden SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM in der Flügelimaginalscheibe ektopisch exprimiert. Der Vorteil der ektopischen Expression der Konstrukte in der Flügelimaginalscheibe liegt einerseits in der Beschaffenheit der Imaginalscheibe und andererseits in der Expressionsdomäne von *engrailed*. Das zweischichtige Epithel der Flügelimaginalscheibe erlaubt im Vergleich zum Embryo eine genauere Auflösung der ektopischen Expression. *engrailed* wird in der Flügelscheibe im kompletten posterioren Kompartiment exprimiert, was eine

Aufteilung in einen ektopisch exprimierenden Teil und einen nicht exprimierenden Teil (anteriores Kompartiment) ermöglicht. Zur Analyse der ektopischen Expression in Flügelimaginalscheiben wurden die SLIT-Konstrukte gegen *en-Gal4* gekreuzt, Larven im L3 Stadium gesammelt und anschliessend präpariert. Die präparierten Flügelimaginalscheiben wurden mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt. Zum einen wurden Doppelfärbungen mit anti-MYC (PAb c-myc) und anti-SLIT durchgeführt, zum anderen wurde die Verteilung der Expression in Doppelfärbungen mit anti-MYC (PAb c-myc) und anti-DISKSLARGE analysiert. Nach erfolgter Antikörperfärbung wurde eine konfokale Analyse der Imaginalscheiben durchgeführt.

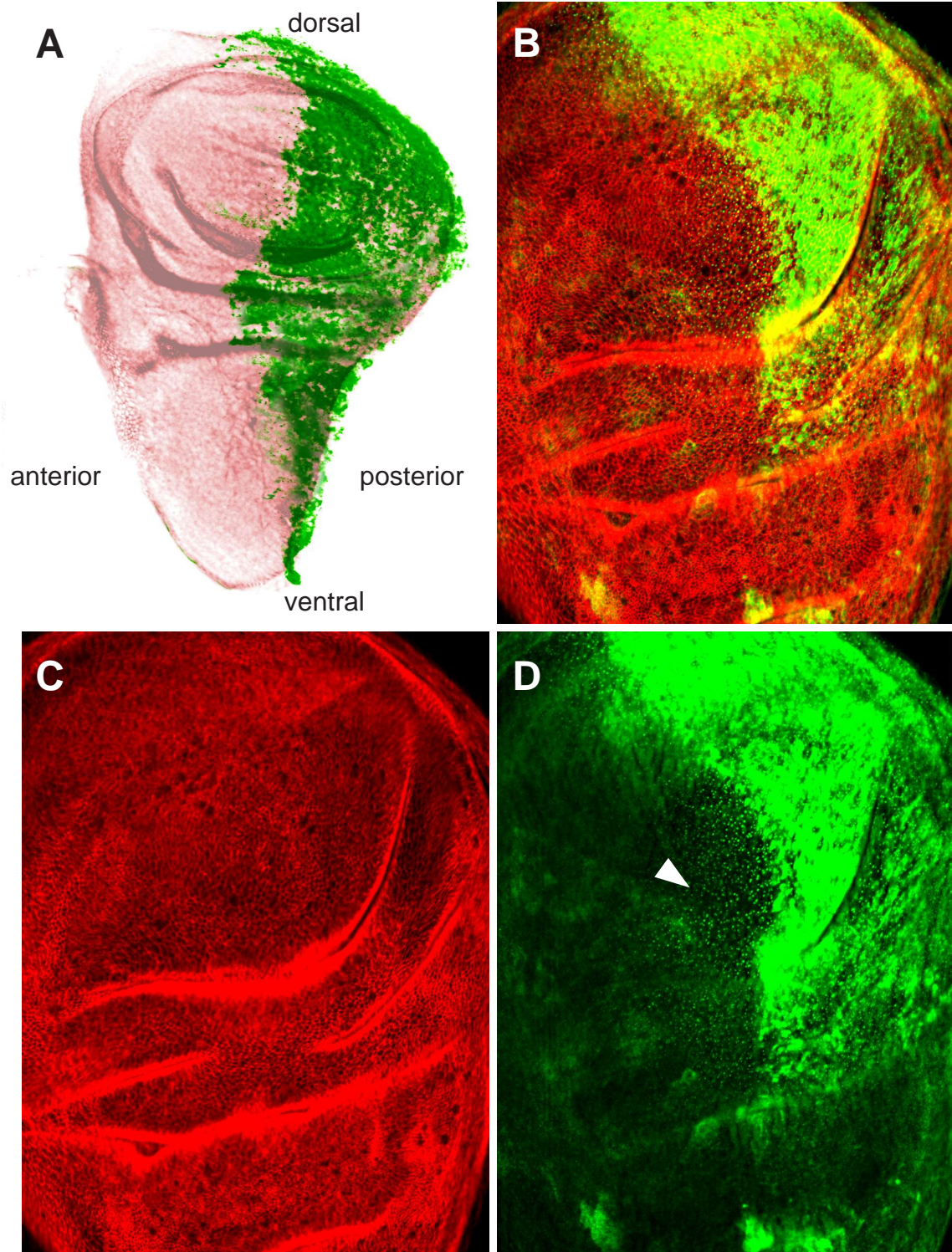
#### **3.3.5.1.1. Ektopische Expression von SLIT-MYC in Flügelimaginalscheiben**

Die konfokale Analyse zeigt eine ektopische Expression von SLIT-MYC im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe (Abb. 48B/D). Zusätzlich zur MYC-Expression sind mit anti-DISCS-LARGE die apikalen Zellgrenzen der Imaginalscheibe markiert worden (Abb. 48C). Bei genauer Betrachtung der ektopischen MYC-Expression ist neben der Expression im posterioren Teil eine punktierte Verteilung außerhalb der *en-Gal4*-Expressionsdomäne zu beobachten (Abb. 48D, Pfeilkopf). Diese punktierte Expression nimmt in Richtung anterior deutlich ab und ist somit graduell verteilt.

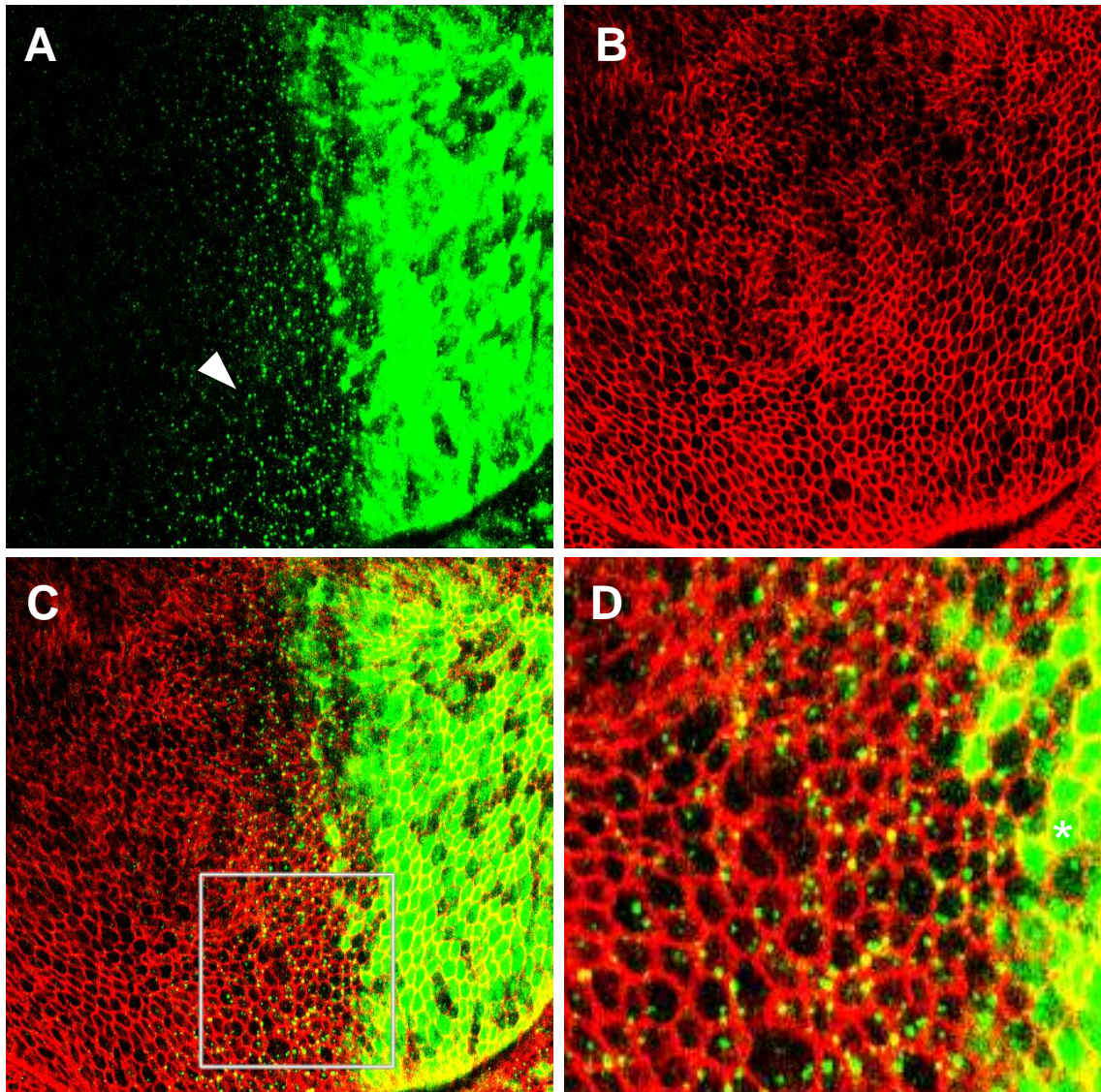
In Abb. 49 ist ein Teil der Flügelimaginalscheibe in einer größeren Auflösung dargestellt. Zusätzlich zu den vorangegangenen Erkenntnissen sind folgende Punkte deutlich zu erkennen. Zum einen zeigt sich in der Überlagerung des MYC-Signals mit dem anti-DISCS-LARGE-Signal, daß die gesamten Zellvolumina des posterioren Kompartimentes von einer MYC-Expression ausgefüllt sind (Abb. 49D, Stern). Zum anderen findet sich eine punktierte Expression außerhalb des posterioren Kompartiments, die sowohl in den Zellkörpern als auch an den Zellgrenzen zu beobachten ist.

Zudem wurde kontrolliert, ob nach ektopischer Expression sowohl das anti-MYC- sowie das anti-SLIT-Epitop nachweisbar ist. Hierzu wurden Doppelfärbungen an Flügelimaginalscheiben mit anti-SLIT und anti-MYC (PAb c-myc) durchgeführt. Abb. 50 zeigt die Koexpression von SLIT und MYC nach ektopischer Expression mittels *en-Gal4*. Dabei findet sich sowohl im posterioren Kompartiment als auch in den punktierten Strukturen außerhalb des Kompartiments eine Kolokalisation (Abb. 50D, Pfeilkopf).



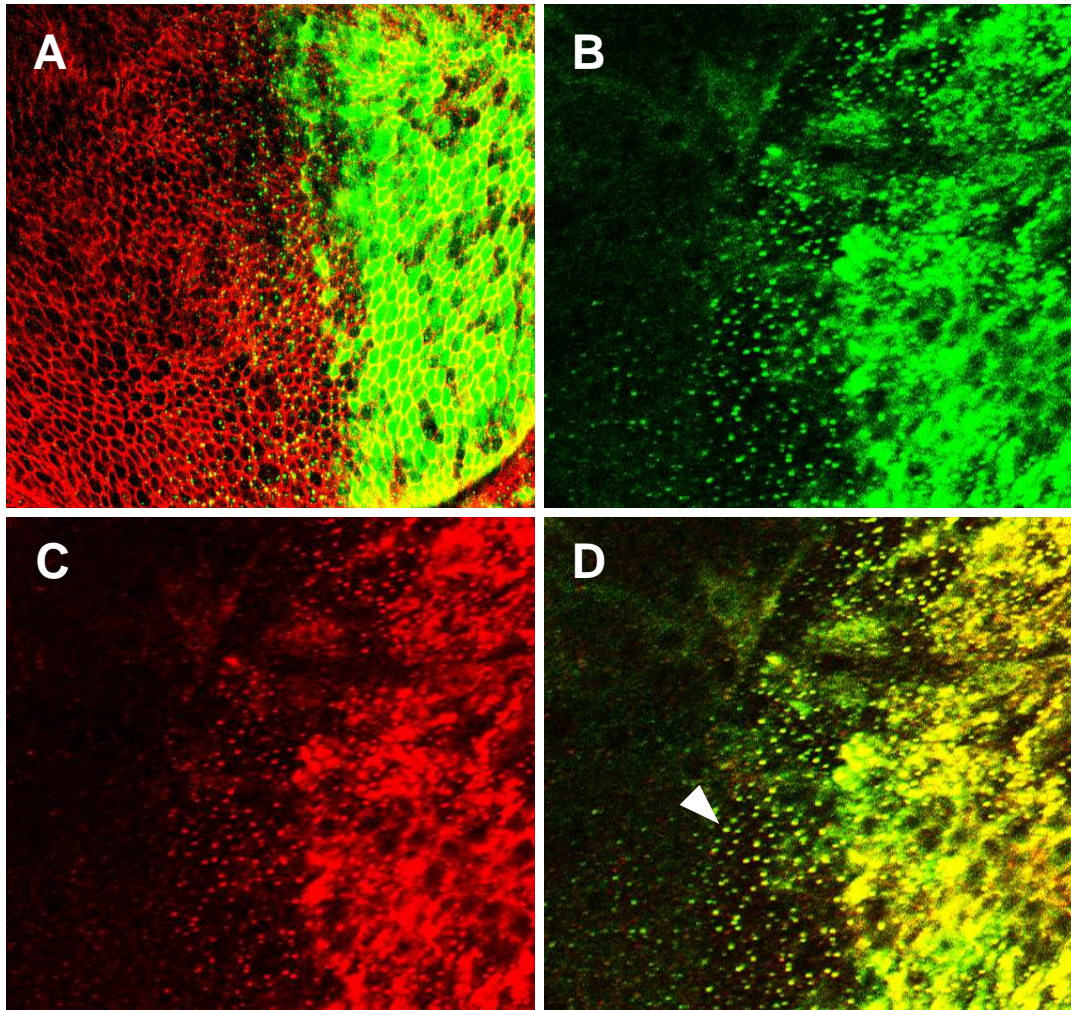


**Abb. 48 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC in Flügelimaginalscheiben**  
 Präparation von Flügelimaginalscheiben im Larvenstadium L3; anterior ist links; Expression von UAS-Slit-MYC mittels *en-Gal4*; Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Discs-Large (rot); anti-Discs-Large markiert die apikalen Zellgrenzen der Imaginalscheibe; (A) Schematische Darstellung der *en-Gal4*-Expressionsdomäne in der Flügelscheibe. (B/D) Slit-MYC wird im kompletten posterioren Kompartiment der Flügelscheibe exprimiert; (B) Überlagerung des MYC- und Discs-Large-Signals (gelb). Neben der Expression in der *en-Gal4* Expressionsdomäne ist ein MYC-Signal außerhalb dieser Domäne zu erkennen; diese Expression tritt punktiert auf (D, Pfeilkopf) und wird in Richtung anterior schwächer.



**Abb. 49 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC in Flügelimaginalscheiben**

Präparation von Flügelimaginalscheiben im Larvenstadium L3; anterior ist links; Expression von UAS-Slit-MYC mittels *en-Gal4*; Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Discs-Large (rot); anti-Discs-Large markiert die apikalen Zellgrenzen der Imaginalscheibe. (A) Neben einer MYC-Expression im posterioren Kompartiment ist eine punktierte Expression außerhalb der *en-Gal4* Expressionsdomäne zu erkennen (A, Pfeilkopf). Diese Expression wird ausgehend vom posterioren Kompartiment in Richtung anterior schwächer. Die Expression im posterioren Kompartiment füllt die gesamten Zellvolumina aus (D, Stern); (D) Vergrößerung der Imaginalscheibe; (C) Kasten markiert den vergrößerten Bereich.



**Abb. 50 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC in Flügelimaginalscheiben**  
 Präparation von Flügelimaginalscheiben im Larvenstadium L3; anterior ist links; Expression von UAS-Slit-MYC mittels *en*-Gal4; (A) Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Discs-Large (rot); (B-D) Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Slit (rot). (D) Nach ektopischer Expression von Slit-MYC findet sich eine Kolokalisation des MYC- und Slit-Signals (Überlagerung der Signale, gelb), sowohl innerhalb als auch außerhalb der *en*-Gal4 Expressionsdomäne. Beide Signale kolokalisieren auch in den punktierten Strukturen (Pfeilkopf).

### 3.3.5.1.2. Ektopische Expression von Slit-Myc-TM in Flügelimaginalscheiben

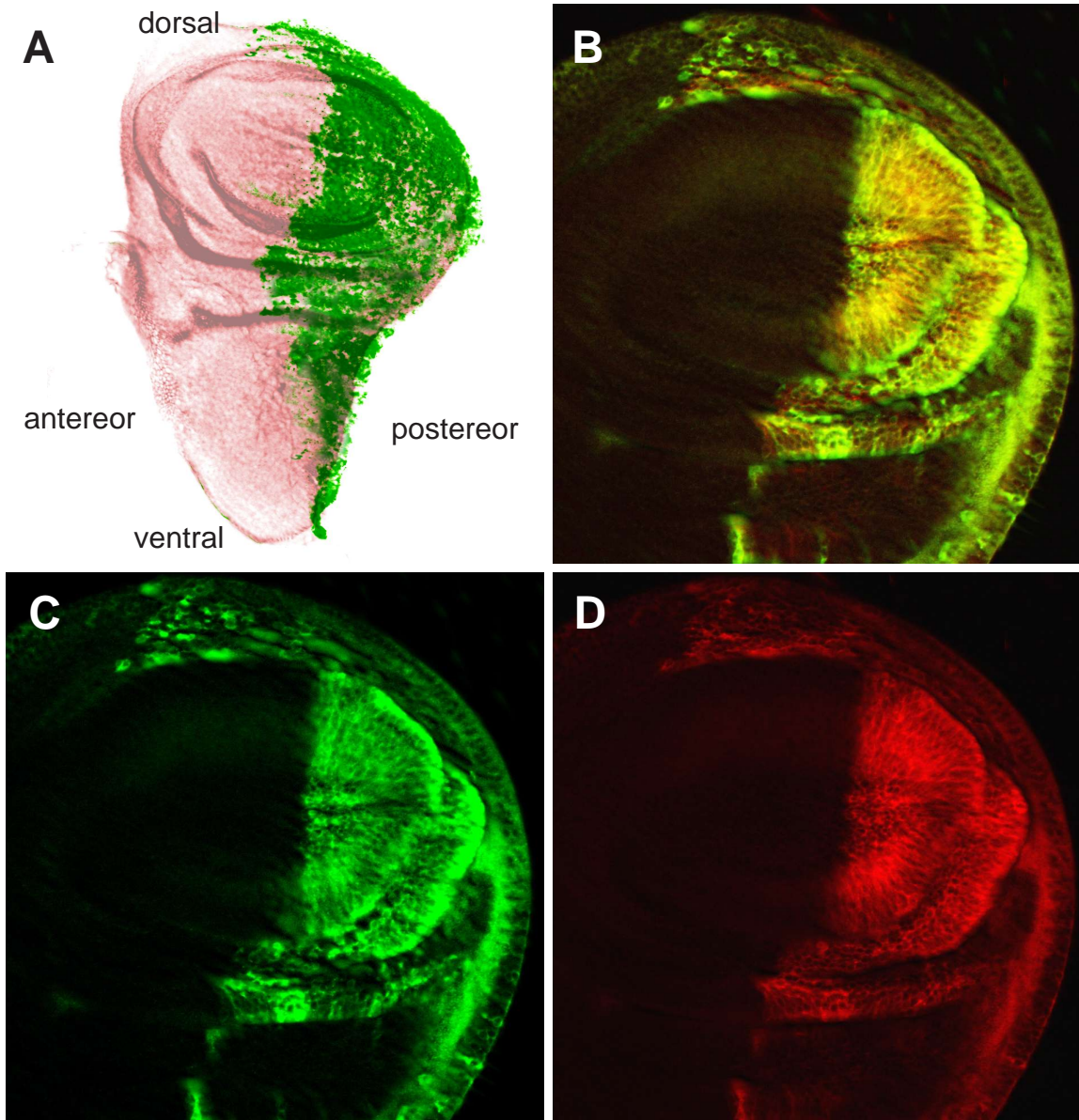
Auch die konfokale Analyse der ektopischen Expression von SLIT-MYC-TM zeigt eine Expression im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe (Abb. 51). Die Antikörperfärbung mit anti-MYC und anti-SLIT zeigt eine Kolokalisation der beiden Signale im posterioren Kompartiment (Abb. 51B). In der Übersicht der Imaginalscheibe ist zudem keine Expression außerhalb der *en-Gal4* Expressionsdomäne zu erkennen. Eine Analyse der Expression von SLIT-MYC-TM in einer höheren Auflösung zeigt ebenfalls keinerlei Expression außerhalb des posterioren Teils der Flügelscheibe (Abb. 52A, Stern). In einer Überlagerung des MYC-Signals mit anti-DISCS-LARGE ist zu erkennen, daß die Expression nicht über eine distinkte Zellreihe hinausgeht (Abb. 52D, Pfeilkopf).

Zum Vergleich der ektopischen Expression von SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM mit der wildtypischen *engrailed* Expression wurde die Expressionsdomäne von *en-Gal4* markiert. Hierzu wurde *UAS-lacZ* im Muster der Treiberlinie exprimiert und die Expression mittels einer Antikörperfärbung mit anti- $\beta$ GAL visualisiert. Der Vergleich der Expression von SLIT-MYC, SLIT-MYC-TM und LACZ mittels *en-Gal4* zeigt, daß lediglich für SLIT-MYC eine Expression außerhalb des posterioren Kompartiments zu beobachten ist (Abb. 53A/B). Die SLIT-MYC-TM- und LACZ-Expressionen beschränken sich auf das posteriore Kompartiment und beide gehen über eine definierte Zellreihe nicht hinaus (Abb. 53D/F, Pfeilkopf). Dies zeigt, daß SLIT-MYC in der Flügelimaginalscheibe sezerniert wird.

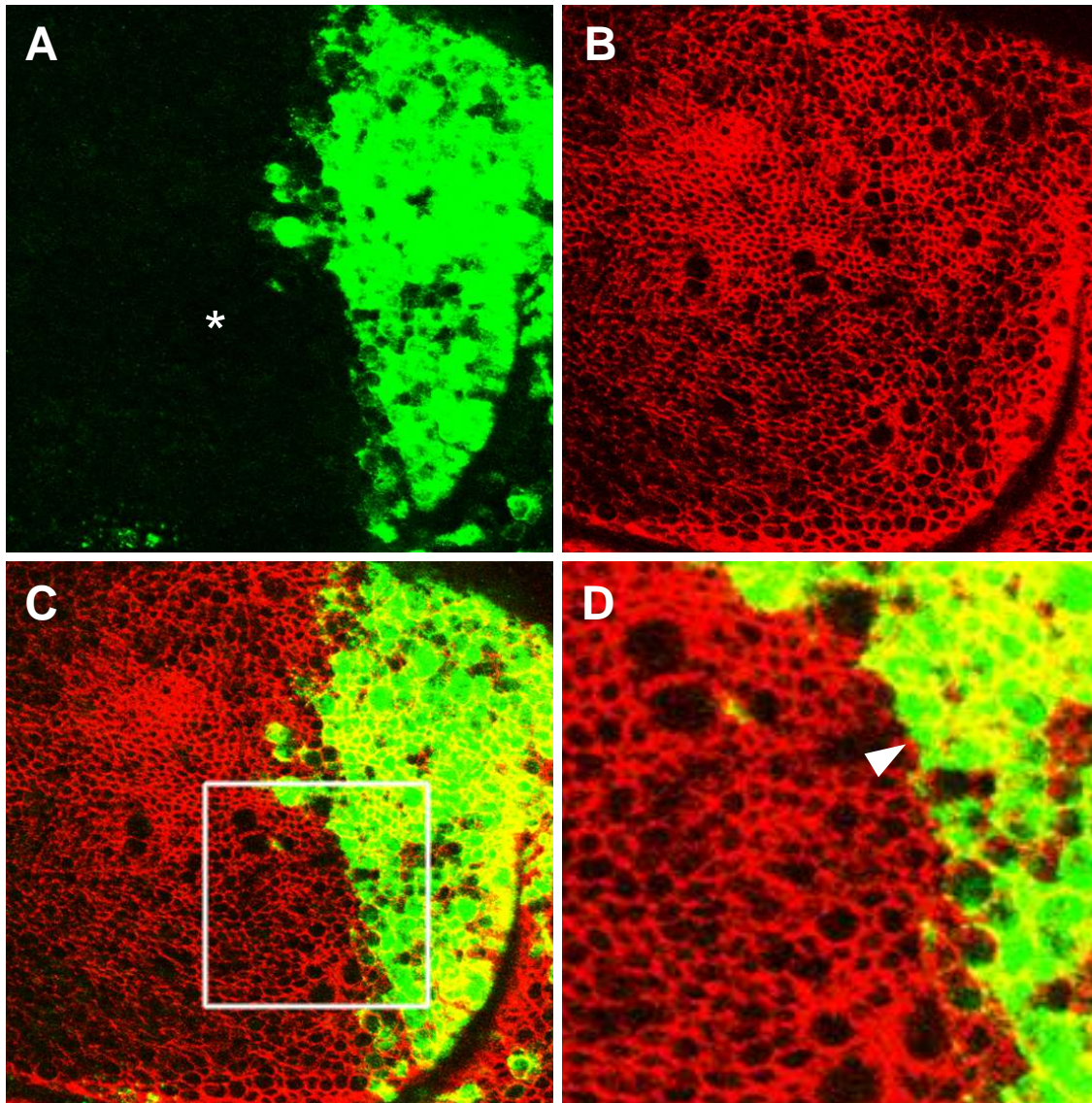
### 3.3.5.1.3. 3D Rekonstruktion

Um die punktierte Expression von SLIT-MYC genauer zu analysieren, wurden mit Hilfe der Computersoftware Volocity 3D-Rekonstruktionen von Flügelimaginalscheiben erstellt. Dabei dienen konfokale Bildstapel als Grundlage, aus denen ein dreidimensionales Modell der untersuchten Strukturen berechnet wird.

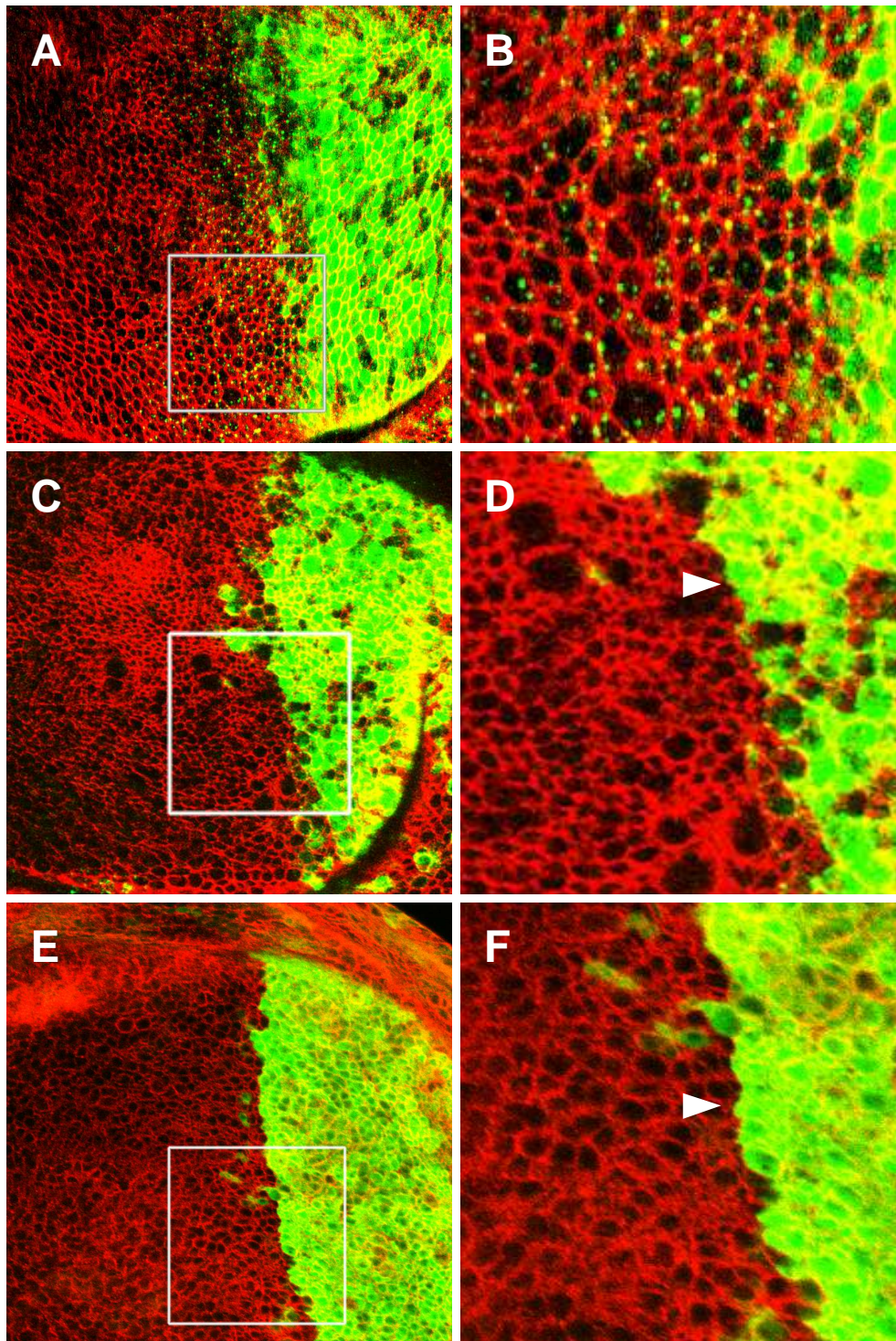
So wurden dreidimensionale Modelle einer Flügelimaginalscheibe nach ektopischer SLIT-MYC-Expression erstellt. Abb. 54 zeigt einige Bilder der 3D Modelle. Dabei markiert anti-DISCS-LARGE die apikalen Zellgrenzen (Abb. 54, rot). Die MYC-Expression ist in grün dargestellt. Die Bilder in Abb. 54B-E zeigen den gleichen Bereich der Flügelscheibe. Abb. 54B und C zeigen eine Übersicht, in 54D ist eine



**Abb. 51 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM in Flügelimaginalscheiben**  
 Präparation von Flügelimaginalscheiben im Larvenstadium L3; anterior ist links; Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels *en*-Gal4; Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Slit (rot); (A) Schematische Darstellung der *en*-Gal4-Expressionsdomäne in der Flügelscheibe. (B-D) Slit-MYC-TM wird im kompletten posterioren Kompartiment der Flügelscheibe exprimiert und beide Signale kolokalisieren (B, Überlagerung, gelb).

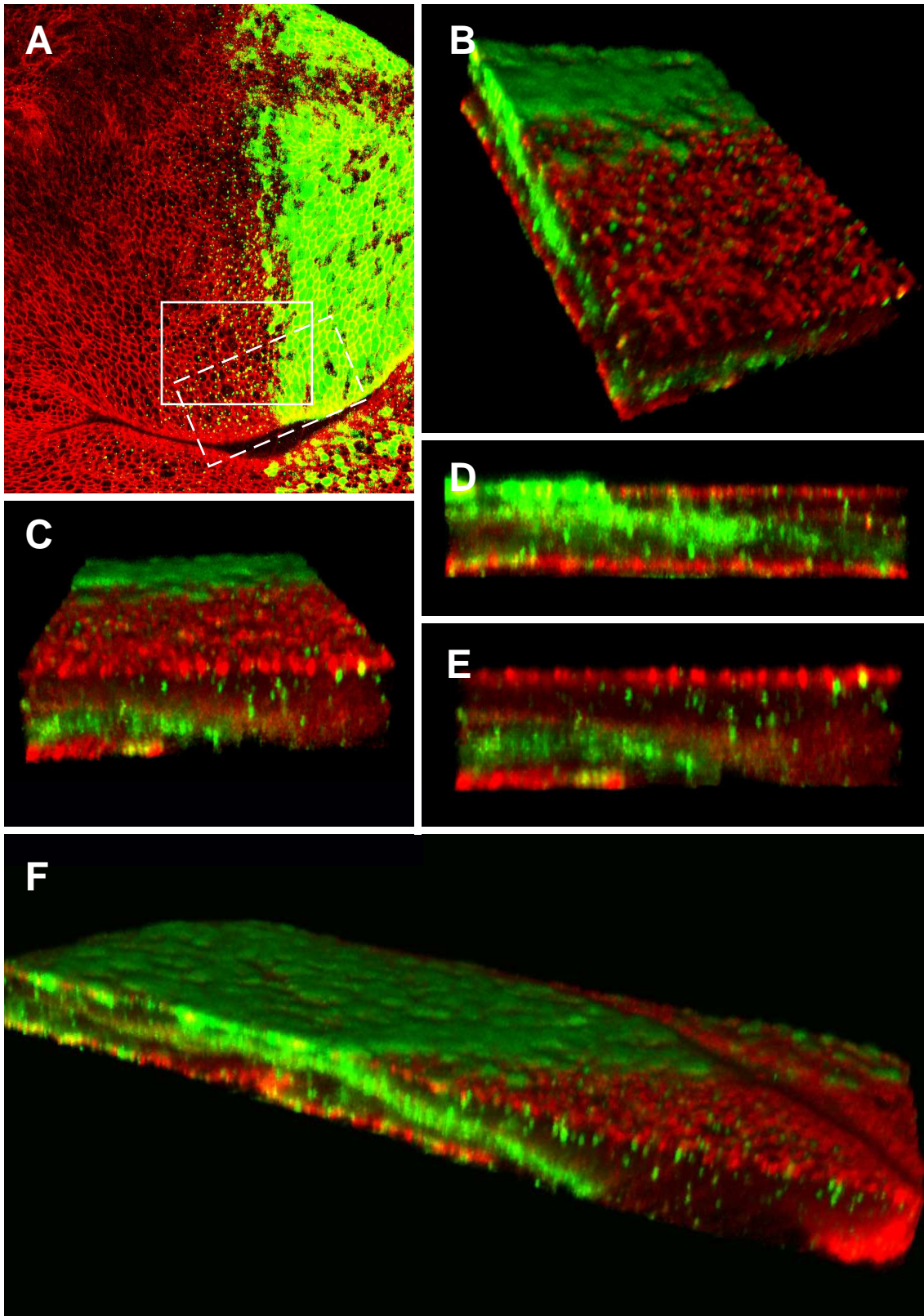


**Abb. 52 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC-TM in Flügelimaginalscheiben**  
 Präparation von Flügelimaginalscheiben im Larvenstadium L3; anterior ist links; Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels *en-Gal4*; Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Discs-Large (rot); anti-Discs-Large markiert die apikalen Zellgrenzen der Imaginalscheibe. Die Expression von Slit-MYC-TM beschränkt sich auf das posteriore Kompartiment (D, Pfeilkopf); außerhalb der *en-Gal4* Expressionsdomäne ist keine Expression zu detektieren (A, Stern).



**Abb. 53 Vergleich der Expression von Slit-MYC, Slit-MYC-TM und LacZ mittels *en-Gal4* in Flügelimaginalscheiben**

Präparation von Flügelimaginalscheiben im Larvenstadium L3; anterior ist links; Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-myc, grün) und anti-Discs-Large (rot); anti-Discs-Large markiert die apikalen Zellgrenzen der Imaginalscheibe. (A/B) Expression von UAS-Slit-MYC mittels *en-Gal4*. (C/D) Expression von UAS-Slit-MYC-TM mittels *en-Gal4*. (E/F) Expression von UAS-lacZ im Muster der *en-Gal4* Treiberlinie. Der Vergleich der Expressionen zeigt, daß lediglich eine Slit-MYC-Expression außerhalb der *en-Gal4* Expressionsdomäne zu detektieren ist.



**Abb. 54 Ektopische Expression von UAS-Slit-MYC in Flügelimaginalscheiben; 3D Bildbearbeitung**

Konfokale Analyse nach ektopischer Expression von Slit-MYC mittels *en-Gal4*; Antikörperfärbung mit anti-MYC (PAb c-ymc, grün) und anti-Discs-Large (rot). Aus den konfokalen Bildstapeln wurden mit Hilfe der Software Volocity 3D-Modelle der Flügelimaginalscheiben erstellt. (A) Die Kästen markieren den Bereich der 3D-Schnitte; durchgezogene Linie (B-E), gestrichelt (F).



## Ergebnisse

seitliche Ansicht und in 54E eine frontale Ansicht des Bereiches dargestellt. Die Bilder zeigen die punktierte Myc Expression außerhalb der *en*-Gal4 Expressionsdomäne. Diese Expression findet sich in den Zellen der Flügelscheibe. Anhand der Dimensionen der "Punkte" ist zu vermuten, daß es sich bei der punktierten Expression um kleine zelluläre Strukturen handelt, zum Beispiel Vesikel.

## 4. Diskussion

In der Entwicklung eines zentralen Nervensystems ist die Verknüpfung von Neuronen mit ihren spezifischen Zielzellen von entscheidender Bedeutung. Diese Verknüpfung erfolgt über lange Zellfortsätze, den Axonen und Dendriten, die in der Neurogenese teilweise über weite Strecken wandern, um ihren synaptischen Partner zu finden. Bei dieser Wegfindung spielen sezernierte Signalmoleküle eine bedeutende Rolle (Dickson, 2002; Kaprielian et al., 2001; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Der Wachstumskegel an der Spitze von Axonen detektiert die sezernierten Signale der Umgebung und findet anhand dieser den korrekten Weg und das richtige Ziel. In dieser Arbeit wurden die sezernierten Signalmoleküle NETRIN und SLIT untersucht. Zusätzlich wurde die Bedeutung der Extrazellulären Matrix (ECM) in der Entwicklung des ZNS analysiert, da eine Beteiligung der ECM in der Regulierung der Sezernierung von Signalmolekülen vermutet wird.

### 4.1. ECM

Die Sezernierung vieler Signalmoleküle erfolgt in den extrazellulären Raum (Dickson, 2002; Yu and Bargmann, 2001). Auch für die Proteine NETRIN und SLIT konnte gezeigt werden, daß es sich um sezernierte Proteine handelt (Brose et al., 1999; Harris et al., 1996a; Kennedy et al., 1994; Mitchell et al., 1996; Rothberg et al., 1990). Zudem konnte für beide Proteine eine wechselseitige Interaktion mit Komponenten der ECM nachgewiesen werden. In *in vitro* Experimenten wurde für NETRIN gezeigt, daß LAMININ die Reaktion des Wachstumskegel auf ein NETRIN-Signal verändert. Im sogenannten "turning assay" wachsen Axone auf eine NETRIN-Quelle zu. Gibt man LAMININ hinzu wird die attraktive Wirkung von NETRIN in ein repulsives Signal umgewandelt (Höpker et al., 1999). Für SLIT konnte sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* eine Interaktion mit verschiedenen Komponenten der ECM nachgewiesen werden. Genetische Untersuchungen in *Drosophila* zeigen einerseits eine Interaktion von SLIT mit Proteinen der Integrin-Familie (Stevens and Jacobs, 2002). Andererseits wurde sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* eine Interaktion von SLIT mit verschiedenen Proteoglycanen nachgewiesen (Hu, 2001; Johnson et al., 2004; Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001; Steigemann et al., 2004).

So ist anzunehmen, daß die ECM Einfluß auf die Verteilung von Signalmolekülen und deren Wirkung nimmt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Auswirkung des Verlustes der Genfunktion verschiedener ECM-Komponenten auf die Entwicklung des ZNS untersucht. Dabei standen verschiedene Muntanten von ECM-Komponenten zur Verfügung.

#### 4.1.1. Phänotypische Analyse von ECM-Mutanten

Die phänotypische Charakterisierung der 14 untersuchten ECM-Mutanten zeigt, daß der Ausfall der Genfunktion nur bei wenigen ECM-Komponenten zu einem Defekt in der Entwicklung des ZNS führt. So hat der Ausfall von LAMININ (LAMININ-A UND LAMININ  $\alpha$ 1), COLLAGEN (COLLAGENIV  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2), TIGGRIN, TENASCIN-M, M-SPONDIN und PERLECAN (TROL) keinen Einfluß auf die Entwicklung des embryonalen ZNS.

Dies könnte einerseits auf eine funktionelle Redundanz der Proteine zurückzuführen sein. Beispielsweise codieren die untersuchten LAMININE und COLLAGENE für einzelne Untereinheiten eines Proteinkomplexes (Gellon et al., 1997; Henchcliffe et al., 1993; Martin et al., 1999; Yasothornsriikul et al., 1997). Fällt eine dieser Untereinheiten aus, kann der Verlust vermutlich durch andere Untereinheiten kompensiert werden. So finden sich im *Drosophila* Genom zwei LAMININ- $\alpha$ -Untereinheiten sowie eine  $\beta$ -Unterheit und drei COLLAGEN-Untereinheiten (Rubin et al., 2000). Auch für TENASCIN wurde neben dem untersuchten TEN-M ein weiteres Protein der Familie im Genom analysiert, TENASCIN-A (Baumgartner and Chiquet-Ehrismann, 1993; Baumgartner et al., 1994).

Andererseits könnte der Verlust der cygotischen Genfunktion auch durch maternale Komponenten kompensiert werden. So wurden für die Proteine LAMININ und COLLAGEN eine starke maternale Komponente nachgewiesen (Kusche-Gullberg et al., 1992; Le Parco et al., 1986).

Für Proteine der Integrin-Familie konnten nach Ausfall der Genfunktion Defekte im ZNS nachgewiesen werden. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, bestehend aus je einer  $\alpha$ -Integrin- und einer  $\beta$ -Integrin-Untereinheit. Diese membranständigen Proteine spielen eine bedeutende Rolle in der Zelladhäsion. Über die Bindung verschiedener ECM-Proteine sorgen die Integrine für eine Zelladhäsion zwischen verschiedenen Zelltypen (Brown, 1993; Brown et al., 2000). Dabei erfolgt eine Bindung an Proteine der ECM, wie beispielsweise COLLAGEN und LAMININ, sowie

an die Proteine FIBRONECTIN in Vertebraten bzw. TIGGRIN in *Drosophila*. Im *Drosophila*-Genom finden sich fünf  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten (Rubin et al., 2000), wobei für drei der  $\alpha$ -Untereinheiten sowie für eine der  $\beta$ -Untereinheiten Mutanten zur Verfügung standen. So konnten Mutanten der Integrine  $\alpha$ -PS1 (*mew*),  $\alpha$ -PS2 (*inflated*),  $\alpha$ -PS3 (*scab*) und  $\beta$ -PS (*myospheroid*) analysiert werden.

Der Ausfall der Integrine  $\alpha$ -PS2,  $\alpha$ -PS3 und  $\beta$ -PS führt im embryonalen ZNS zu einem abnormen Phänotyp. So konnten für  $\alpha$ -PS2 und  $\beta$ -PS Integrin sowohl in MAb BP102- als auch in anti-FASII-Färbungen Defekte in der Organisation des Axonmusters im ZNS beobachtet werden. Der Ausfall des  $\alpha$ -PS3 Integrins führt lediglich zu Defekten im embryonalen ZNS, die in anti-FASII Färbungen zu erkennen sind. Dabei betreffen die beobachteten Defekte hauptsächlich die longitudinalen Axontrakte. Das kommissurale Wachstum ist nicht betroffen. Die longitudinalen Faszikel sind teilweise defaszikuliert und die lateralen Axontrakte verlaufen in untypischen Bahnen. Die beobachteten Phänotypen in anti-FASII-Färbungen beschränken sich auf die Organisation der longitudinalen Faszikel. Ein abnormes Kreuzen von Axonen über die ZNS-Mittellinie konnte nicht beobachtet werden. Neben der Analyse von Mutanten konnte für  $\alpha$ -PS2 Integrin zusätzlich ein Genverlust mittels "RNA-interference" induziert werden (Lee and Carthew, 2003). Dabei führt der lokale Genverlust von  $\alpha$ -PS2 Integrin im embryonalen ZNS zu vergleichbaren Defekten in der Entwicklung des embryonalen ZNS.

Eine Bedeutung der Integrine in der axonalen Wegfindung wurde zunächst aus *in vitro* Experimenten abgeleitet. So wurde postuliert, daß Integrine für die Bindung des Wachstumskegels an ein Substrat verantwortlich sind und zwar über die Verknüpfung der ECM mit dem Actincytoskellet (Felsenfeld et al., 1996). So werden auch in *Drosophila* Integrine in Wachstumskegeln exprimiert (Takagi et al., 2000; Takagi et al., 1998). Zudem findet sich auch im *Drosophila* ZNS eine Expression der Integrin-Liganden TIGGRIN und LAMININ (Fogerty et al., 1994; Montell and Goodman, 1989).

Neben der Bedeutung der Integrine in der mechanischen Bindung eines Wachstumskegels an ein Substrat, weisen weitere Ergebnisse darauf hin, daß die Integrine zudem eine Rolle in verschiedenen Signalwegen spielen. Hoang et. al. (1998) postulieren, daß in *Drosophila* die Integrine kooperativ mit weiteren Signalmolekülen für eine Genauigkeit des axonalen Wachstum verantwortlich sind. Außerdem konnte in *Drosophila* eine genetische Interaktion von SLIT mit Integrinen gezeigt werden (Stevens and Jacobs, 2002).

Die in dieser Arbeit beobachteten Defekte nach dem Genverlust von Integrinen deuten sowohl auf eine Beteiligung in der mechanischen Bindung der Axone, als auch auf eine Bedeutung im SLIT-Signalweg hin. Zum einen weisen die defaszikulierten Faszikel in den Integrin-Mutanten darauf hin, daß die Bindung der Axone untereinander gestört ist. Zum anderen beschränken sich die beobachteten Defekte auf die longitudinalen Faszikel, was auf eine Bedeutung im SLIT-Signalweg weist (siehe 4.1.2.1). Um die Bedeutung der Integrine in der Entwicklung von *Drosophila* genauer zu verstehen sind allerdings weitere Experimente erforderlich.

In Vertebraten gibt es eine Vielzahl von Integrinen. So bilden in der Maus 8  $\beta$ - und 18  $\alpha$ -Untereinheiten mindestens 24 verschiedene Integrin-Heterodimere. In der Maus konnten für 7 der 8  $\beta$ -Untereinheiten und für 13 der 18  $\alpha$ -Untereinheiten Knock-outs etabliert werden. Die Analyse der knock-out Mäuse zeigt distinkte Phänotypen in der Embryogenese, wobei verschiedenste Gewebe betroffen sind (Sheppard, 2000). Defekte in der axonalen Wegfindung konnten allerdings nicht beobachtet werden. Dies könnte allerdings auf die größere Vielzahl von Integrinen zurückgeführt werden. In Vertebraten ist daher eine Kompensation nach dem Ausfall einer Integrin-Untereinheit eher denkbar.

Neben den Integrinen zeigen auch Mutanten der Heparan-Sulfat-Proteoglycane (HSPG) DALLY und SYNDECAN Defekte im embryonalen ZNS. Eine Mutation im Gen *dally* führt zur Fusion der Kommissuren im embryonalen ZNS sowie zu Defekten im Wachstum der longitudinalen Axontrakte. DALLY zählt zur Familie der Glypicane, einer Gruppe von membranständigen HSPGs. Für DALLY wurden Funktionen in der Regulation des Zellzyklus, des *dpp*-Signaling, der *hedgehog* Verteilung in der Flügelimaginalscheibe und eine Interaktion mit dem *wingless*-Signaltransduktionsweg nachgewiesen (Fujise et al., 2003; Han et al., 2004; Jackson et al., 1997; Lin and Perrimon, 1999; Nakato et al., 1995; Tsuda et al., 1999). Der Phänotyp der *dpp*- und *wingless*-Mutanten, der aufgrund der frühen Funktion der beiden Gene sehr drastisch ist, läßt sich allerdings nicht mit den *dally*-Phänotypen vergleichen. Daher ist fraglich, ob die ZNS-Defekte auf eine Bedeutung in den Signaltransduktionswegen der Morphogene zurück zu führen sind. In Vertebraten konnte eine Interaktion des DALLY-Homologs GLYPICAN-1 mit SLIT sowie eine Kolo-kalisation der beiden Proteine nachgewiesen werden (Ronca et al., 2001). So könnten die Phänotypen eher auf eine Bedeutung von DALLY in der SLIT-Interaktion zurückzuführen sein. Die Fusion der Kommissuren deutet dabei auf eine Störung in der axonalen Repulsion an der Mittellinie hin, da mehr Axone als im Wildtyp die Mittellinie kreuzen. Auch die Defekte

der longitudinalen Axontrakte könnte auf eine Interaktion mit dem SLIT-Signal zurückzuführen sein (siehe 4.1.2.1).

Neben DALLY findet sich im *Drosophila* Genom ein weiteres Protein der Glypican Familie, DALLY-LIKE (Khare and Baumgartner, 2000). Für DALLY-LIKE wurde eine Funktion im HEDGEHOG Signaltransduktionsweg (Desbordes and Sanson, 2003) sowie eine Funktion in der Verteilung des Morphogens nachgewiesen (Han et al., 2004). Zudem konnte für DALLY-LIKE eine Bedeutung in der SLIT-Wirkung gezeigt werden (Johnson et al., 2004; Steigemann et al., 2004).

Neben DALLY führt auch der Ausfall von SYNDECAN zu Defekten im ZNS. Die Proteine der SYNDECAN-Familie stellen neben den Glypicanen die zweite wichtige Gruppe der HSPGs dar. In *Drosophila* führt eine Mutation im Gen *syndecan* zu einer Desorganisation der longitudinalen Axontrakte. Im Vergleich zur DALLY-Mutante fallen die Defekte im ZNS allerdings deutlich schwächer aus. Für SYNDECAN konnte in *Drosophila* eine Bedeutung im SLIT-Signal nachgewiesen werden (Johnson et al., 2004). Im *Drosophila*-Genom findet sich nur ein Protein der SYNDECAN-Familie (Spring et al., 1994), in Vertebraten dagegen wurden vier SYNDECANE identifiziert. Die gezielte Ausschaltung von SYDECAN-1 in der Maus zeigt kaum Defekte in der Embryogenese (Perrimon and Bernfield, 2000). Vermutlich wird der Genverlust durch die weiteren SYNDECANE oder andere HSPGs kompensiert. Allerdings konnte eine Bedeutung von Syndecan als stimulierender Faktor im Neuritenwachstum gezeigt werden (Akita et al., 2004). Zudem wurde eine Expression von Syndecan-3 auf Axonen nachgewiesen (Hsueh and Sheng, 1999).

HSPGs bestehen aus einem Kern-Protein sowie einer spezifischen Heparan-Sulfat Polysacharidkette. In biochemischen Analysen sowie in Zellkulturexperimenten wurden HSPGs zunächst als strukturelle Proteine der extrazellulären Umgebung beschrieben. So wurde beispielsweise eine Funktion in der Zell-Adhesion und Proliferation nachgewiesen (Bernfield et al., 1999).

Neuere genetische Untersuchungen in Vertebraten, *C. elegans* und *Drosophila* zeigen allerdings immer mehr die Bedeutung der HSPGs in der Interaktion zwischen spezifischen extrazellulären Liganden und deren Rezeptoren (Perrimon and Bernfield, 2000). So konnte beispielsweise in *C. elegans* nachgewiesen werden, daß die Spezifität der Heparan-Sulfat-Ketten von HSPGs eine Bedeutung in verschiedenen Aspekten der neuronalen Entwicklung hat (Bulow and Hobert, 2004). *In vitro* konnte zudem gezeigt werden, daß HSPGs die Bindungsaffinität von SLIT und

ROBO beeinflussen und eine Rolle in der repulsiven Aktivität von SLIT spielen (Hu, 2001).

#### 4.1.2. Ektopische Expression

Neben der Analyse der unterschiedlichen ECM-Mutanten wurden zudem Überexpressionsstudien durchgeführt. Dabei hat die ektopische Expression der meisten ECM Komponenten keinen Einfluß auf die Entwicklung des ZNS. Lediglich die ektopische Expression einiger Integrine sowie der HSPGs DALLY und SYNDECAN führt zu Defekten im embryonalen ZNS. Dabei ist zu beobachten, daß lediglich eine ektopische Expression der Proteine in der ZNS-Mittellinie zu einem abnormen Phänoyp führt.

So findet sich nach ektopischer Expression der Integrine  $\alpha$ -PS2,  $\alpha$ -PS3,  $\beta$ -PS und  $\beta$ nu-PS in der ZNS-Mittellinie ein Defekt im embryonalen Nervensystem. Die Defekte beschränken sich, ähnlich der Defekte in Integrin-Mutanten, auf die Entwicklung der longitudinalen Axontrakte. In der Entwicklung der Kommissuren konnten nach ektopischer Expression keinerlei Defekte beobachtet werden.

In *Drosophila* wurde beschrieben das die ektopische Expression von  $\alpha$ -PS1 und  $\alpha$ -PS2 Integrin im Flügel zu einer Blasenbildung und somit zu einer Phänokopie eines Genverlustes führt (Brabant et al., 1996). Allerdings konnte nicht geklärt werden, worauf der Flügelphänotyp beruht. Im Embryo hingegen konnten nach ektopischer Expression von  $\alpha$ -PS1 und  $\alpha$ -PS2 Integrin keine Defekte in der Darm- und Muskelentwicklung beobachtet werden (Martin-Bermudo et al., 1997).

Um die Defekte im ZNS zu erklären bedarf es weiterer Analysen. Allerdings könnte die ektopische Expression einer einzelnen Integrin-Unterheit das Gleichgewicht der Integrine stören. Falls Integrine tatsächlich in Kooperation mit weiteren Signalmolekülen für die Regulierung des axonalen Wachstums verantwortlich sind, wäre es denkbar, daß diese Störung die Regulation beeinflusst.

Auch die ektopische Expression der HSPGs DALLY und SYNDECAN in der ZNS-Mittellinie führt lediglich zu Defekten im Wachstum der longitudinalen Faszikel. Das kommissurale Wachstum ist nicht gestört. Die Defekte nach einer ektopischen Expression von HSPGs im ZNS lassen sich durch eine mögliche Bindung von Signalmolekülen an die Proteoglycane erklären. Für die Signalmoleküle NETRIN und SLIT konnte gezeigt werden, daß die korrekte Verteilung des Proteins von

entscheidender Bedeutung ist. Eine Änderung der Dosis im ZNS führt bei beiden Proteine zu Defekten im ZNS (Harris et al., 1996a; Kidd et al., 1999; Mitchell et al., 1996). Daher ist es denkbar, daß die ektopische Expression von HSPGs die Verteilung bzw. die Dosis von Signalmolekülen beeinflusst und so die Entwicklung des ZNS stört. Wie bereits erwähnt, konnte für das DALLY-Homolog, GLYPICAN-3, eine Bindung an SLIT nachgewiesen werden (Ronca et al., 2001). Somit wäre es möglich, daß die Erhöhung der HSPG-Menge in der ZNS-Mittellinie die korrekte Verteilung von SLIT beeinflusst und so zu Fehlprojektionen der longitudinalen Axontrakte führt.

#### **4.1.2.1. Interaktionen von Integrinen und Proteoglycanen mit SLIT**

Für einige Integrine und die HSPGs DALLY und SYNDECAN wurde gezeigt, daß sowohl der Verlust der Genfunktion als auch die ektopische Expression im embryonalen ZNS zu Defekten in der ZNS Entwicklung führt. Dabei finden sich hauptsächlich Defekte in der Entwicklung der longitudinalen Faszikel.

In der Entwicklung des embryonalen ZNS von *Drosophila* konnte für die longitudinalen Faszikel gezeigt werden, daß das Rezeptor-Liganden-System SLIT/Robo für die korrekte Entwicklung des Axonmusters verantwortlich ist. Durch den sogenannten ROBO-Code werden Axone in die korrekten longitudinalen Bahnen "sortiert" (Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000).

Da sich die beobachteten Phänotypen vornehmlich in den longitudinalen Axontrakten bemerkbar machen, ist anzunehmen, daß Integrine und die HSPGs DALLY und SYNDECAN einen Einfluß auf das Rezeptor-Liganden-System SLIT/Robo ausüben. Wie zuvor erwähnt konnte bereits gezeigt werden, daß SLIT sowohl mit Integrinen als auch mit Proteoglycanen interagiert. Für ein Vertebraten-Homolog von DALLY, GLYPICAN-1, konnte in der Ratte eine Kolo-kalisation mit SLIT im ZNS gezeigt werden. Zudem wurde *in vitro* eine Bindung von GLYPICAN-1 an den C-terminalen Teil von SLIT nachgewiesen (Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001). In *Drosophila* wurde eine Interaktion von SLIT mit Integrinen (Stevens and Jacobs, 2002) sowie mit Syndecan und Dally-like nachgewiesen (Johnson et al., 2004; Steigemann et al., 2004). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, daß HSPGs die Bindungsaffinität von SLIT und ROBO beeinflussen und eine Rolle in der repulsiven Aktivität von SLIT spielen (Hu, 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Thesen und weisen ebenfalls auf eine Interaktion von Integrinen und HSPGs mit SLIT hin. Allerdings scheint nur die "long-range" Funktion von SLIT betroffen zu sein. In der "short-range" Funktion von



SLIT, der Repulsion der Axone von der ZNS-Mittellinie, konnten keine Defekte beobachtet werden. So wurde weder in der Analyse der Mutanten noch in den Überexpressionsstudien ein abnormes Kreuzen von Axone über die Mittellinie beobachtet. In anti-FasII-Färbungen war stets eine Trennung der Faszikel an der ZNS-Mittellinie zu beobachten. Dieses deutet darauf hin, daß die untersuchten Integrine und Proteoglycane eine Bedeutung in der Verteilung des Signalmoleküls SLIT haben könnten. Dieses wird durch die Erkenntnisse unterstützt, daß lediglich eine ektoische Expression der Proteine in der ZNS-Mittellinie zu Defekten im ZNS führt. Eine ektoische Expression ausserhalb der endogenen SLIT-Expressionsdomäne hat hingegen keinen Einfluß auf die Entwicklung des ZNS.

#### 4.2. SLIT

SLIT vermittelt in Vertebraten und *Drosophila* eine repulsive Wirkung auf wandernde Axone (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1990). Der Verlust der *slit*-Genfunktion führt im embryonalen ZNS von *Drosophila* zu einem Kollaps des ZNS an der Mittellinie (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1990). Die Repulsion von Axonen, die nach dem Kreuzen der Mittellinie diese normalerweise verlassen, unterbleibt in *slit*-Mutanten. Die Axone verbleiben in der Mittellinie und das regelmäßige Axonmusters des ZNS kann nicht ausgebildet werden.

Die Analyse der SLIT-Rezeptoren, den Proteinen der ROBO-Familie, zeigt neben der Funktion von SLIT als repulsives Signal für kommissurale Axone die Bedeutung von SLIT und ROBO in der Organisation der longitudinalen Axontrakte (Long et al., 2004; Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000). Die Rolle von SLIT in der Organisation der longitudinalen Faszikel deutet auf eine long-range Funktion hin. *slit* wird im ZNS in den Mittelliniengliazellen exprimiert. Um so eine Wirkung auf longitudinale Axone auszuüben, ist eine Sezernierung des Proteins erforderlich. Der Vergleich der RNA-Expression von *slit* mit der Protein-Expression in *Drosophila* zeigt, daß das SLIT-Protein tatsächlich auf longitudinalen Axonen nachgewiesen werden kann (Johnson et al., 2004) und diese Arbeit). In Zellkulturexperimenten konnte außerdem für SLIT eine Funktion als sezerniertes Signalmolekül gezeigt werden (Brose et al., 1999; Li et al., 1999). Daher wurde für die Funktion von SLIT eine Proteingradient postuliert. Der vorhergesagte Gradient wird von wandernden Axonen erkannt und interpretiert. In dieser Arbeit sollte die Sezernierung sowie eine mögliche Gradienten-Bildung genauer untersucht werden.

#### 4.2.1. SLIT-Konstrukte

Um die SLIT-Funktion und -Verteilung in *Drosophila* genauer zu betrachten, wurden zwei verschiedene SLIT-Konstrukte generiert. Zum einen wurde ein SLIT-Konstrukt kloniert, das im N-Terminus durch ein 8-fach MYC-Epitop markiert wurde (SLIT-MYC). Zum anderen wurde ein weiteres Konstrukt generiert, das neben dem N-terminalen MYC-Epitop im C-terminalen Bereich eine Transmembrandomäne trägt (SLIT-MYC-TM). Diese beiden Konstrukte erlauben es, verschiedene Aspekte der SLIT-Funktion und -Verteilung *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

##### 4.2.1.1. SLIT-MYC- und SLIT-MYC-TM-Expression in Schneider-Zellen

Die beiden SLIT-Konstrukte wurden zunächst in Zellkultur getestet und in *Drosophila* Schneider-Zellen (S2-Zellen) exprimiert. Die Analyse der Protein-Verteilung in S2-Zellen deckte dabei Unterschiede in der Expression der beiden Konstrukte auf.

SLIT-MYC zeigt eine starke cytoplasmatische Expression, die insbesondere um den Zellkern lokalisiert ist. Zudem ist zu erkennen, daß SLIT-MYC sezerniert wird und sich sowohl eine MYC- als auch eine SLIT-Expression außerhalb der S2-Zellen befindet. Western-Blot-Analysen konnten nicht eindeutig zeigen, ob SLIT auch in S2-Zellen proteolytisch gespalten wird. Im Falle einer proteolytischen Spaltung wäre ein Unterschied zwischen der N-terminalen MYC und der C-terminalen SLIT-Expression zu erwarten. Allerdings zeigen die Antikörperfärbungen, daß sich die Expression der beiden Epitope nicht unterscheidet. Dies weist nach, daß SLIT in S2-Zellen nicht prozessiert wird.

Vergleicht man die Expression von SLIT-MYC-TM- mit der SLIT-MYC-Expression, sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Zunächst findet sich lediglich eine schwache cytoplasmatische Expression von SLIT-MYC-TM. Die Expression der beiden Marker ist hauptsächlich an der Membran lokalisiert. Auffällig ist dabei, daß die SLIT-MYC-TM-Expression punktiert auftritt. Dies läßt folgendes vermuten. Zum einen deutet die Membranexpression darauf hin, daß SLIT-MYC-TM tatsächlich an der Membran gebunden wird. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Transmembrandomäne funktional ist. Um eine Bindung an der Membran eindeutig nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Beispielsweise könnte eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation durchgeführt werden, um Proteinextrakte in

cytoplasmatische und Membran-Fractionen zu unterteilen. In Western-Blot Analysen könnte anschließend die subzelluläre Lokalisation von SLIT-MYC-TM geklärt werden. Zum anderen gibt die punktierte Expression des Proteins erste Hinweise auf die subzelluläre Verteilung. So weist eine punktierte Verteilung des Proteins auf kleine zelluläre Strukturen, wie beispielsweise Vesikel, hin. Allerdings erlaubt dies keine Rückschlüsse auf die wildtypische Verteilung von SLIT, da die Expression von SLIT-MYC nicht punktiert auftritt. Der Vergleich der MYC- und SLIT-Expression zeigt geringe Unterschiede in der Verteilung. An der Membran sind beide Marker eindeutig kolokalisiert. Allerdings findet sich um den Zellkern sowie im Cytoplasma eine deutlich stärkere SLIT-Expression.

Die MYC-Expression an der Membran deutet auch hier darauf hin, daß SLIT-MYC-TM in S2-Zellen nicht proteolytisch gespalten wird. Da sich die Transmembrandomäne am C-Terminus befindet sollte nach einer Proteolyse der N-Terminus nicht mehr transmembran gebunden sein.

Die Markierung des Aktincytoskeletts zeigt zudem morphologische Defekte nach der SLIT-MYC-TM-Expression. Die Zellen kollabieren und verlieren ihre normale Gestalt. Da in S2-Zellen kein Protein der ROBO-Familie exprimiert wird, ist unter Umständen ein bisher unbekannter SLIT-Rezeptor für den Kollaps der S2-Zellen verantwortlich. Genaue Analysen der morphologischen Defekte stehen allerdings noch aus.

#### **4.2.1.2. Ektopische Expression von SLIT-Myc und SLIT-Myc-TM**

Die ektopische Expression der SLIT-Konstrukte *in vivo*, sowohl in embryonalen als auch in imaginalen Geweben, sollte Aufschluß über die Verteilung des SLIT-Proteins geben. Aus dem Vergleich der Expression der beiden Konstrukte, sowie aus dem Vergleich der Expression des N-Terminus (MYC) und des C-Terminus (SLIT) können Erkenntnisse über die wildtypische Verteilung von SLIT gewonnen werden.

Um die Ergebnisse einer ektopischen Expression bewerten zu können ist der Nachweis einer biologischen Funktionalität der klonierten SLIT-Konstrukte von großer Bedeutung. Dies wurde zunächst durch Rettungsexperimente geklärt. So konnte gezeigt werden, daß durch eine ektopische Expression des SLIT-MYC-Konstruktes in der ZNS-Mittellinie der Phänotyp der Mutation *slit*<sup>B1-32</sup> gerettet werden kann. Daher kann davon ausgegangen werden, daß sich SLIT-MYC genau wie wildtypisches SLIT verhält. Die biologische Funktionalität wird durch das MYC-Epitop nicht beeinflusst.

Die Rettungsexperimente für SLIT-MYC-TM zeigen ebenfalls eine Rettung des *slit*<sup>B1-32</sup> mutanten Phänotyps. Die Expression von SLIT-MYC-TM in S2-Zellen legt eine Bindung des Konstruktes an der Membran nahe. Bei einer Expression von SLIT-MYC-TM in der ZNS-Mittellinie ist davon auszugehen, daß auch hier eine Sezernierung des ektopischen Proteins unterbleibt. Da allerdings die Expression zu einer Rettung des *Slit*<sup>B1-32</sup> mutanten Phänotyps führt, ist zu vermuten, daß das Protein prozessiert wird. Der C-Terminus wird so trotz der Transmembrandomäne sezerniert und ist für die Rettung verantwortlich. In *Drosophila* konnte zudem gezeigt werden, daß der C-terminale Teil von SLIT für die biologische Funktionalität in der axonalen Wegfindung verantwortlich ist (Battye et al., 2001). Um allerdings eine Prozessierung des SLIT-MYC-TM Konstruktes eindeutig in *Drosophila* nachzuweisen, sind weiterführende Western-Blot-Analysen erforderlich.

#### **4.2.1.2.1. Embryonale Überexpression mittels *en-Gal4***

Zunächst wurden beide SLIT-Konstrukte im Muster der *en-Gal4* Treiberlinie exprimiert. Der Vergleich der Expression von SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM im *en-Gal4* Muster zeigt deutliche Unterschiede. Zunächst ist zu erkennen, daß beide Konstrukte im *Drosophila*-Embryo exprimiert werden können. So findet sich nach ektopischer Expression sowohl eine MYC- als auch eine SLIT-Expression im *engrailed*-Muster. Dabei ist eine Kolo-kalisation der beiden Marker zu beobachten. Eine genaue Betrachtung der Expression zeigt jedoch Unterschiede in der Verteilung. So ist nach Expression des SLIT-MYC-Konstruktes eine MYC und eine SLIT-Expression außerhalb der *en-Gal4* Expressiondomäne zu erkennen. Diese Expression tritt zudem punktiert auf. Ein Vergleich mit der Expression des SLIT-MYC-TM-Konstruktes zeigt, daß sich die Expression auf die *engrailed* Streifen beschränkt. Daraus läßt sich ableiten, daß SLIT-MYC sezerniert wird. Außerdem weist die punktierte Expression auf eine endocytotische Verteilung des ektopischen Proteins hin. Um welche Strukturen es sich handelt, muß in weiterführenden Studien geklärt werden.

Da nach ektopischer Expression von SLIT-MYC-TM keine Sezernierung des Proteins beobachtet werden kann, ist davon auszugehen, daß auch im *Drosophila*-Embryo die Transmembrandomäne funktional ist.

#### 4.2.1.2.2. Embryonale Überexpression mittels *elav-Gal4* und *rho-Gal4*

Nach der ektopischen Expression der SLIT-Konstrukte mittels *en-Gal4* wurden diese im embryonalen ZNS mittels *elav-Gal4* und *rho-Gal4* exprimiert.

Die ektopische Expression mittels *elav-Gal4* zeigt für SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM eine Expression im kompletten Neuropil. Dies ist in Doppelfärbungen mit neuronalen Markern zu erkennen. Dabei ist auffällig, daß in lateralen Bereichen des Neuropils die Expression im Vergleich zur Mitte stärker ist. Zudem zeigt sich in den lateralen Bereichen ein Unterschied in der Expression der beiden SLIT-Konstrukte. Nach der ektopischen Expression von SLIT-MYC ist zu erkennen, daß sich in lateralen Bereichen die SLIT-MYC-Expression außerhalb der neuronal markierten Bereiche befindet. Der Vergleich mit der SLIT-MYC-TM-Expression zeigt, daß sich hier die Expression auf das Neuropil beschränkt. In allen Bereichen ist eine Kolo-kalisation mit neuronalen Markern zu beobachten. Dies zeigt ebenfalls, daß SLIT-MYC sezerniert wird und eine Sezernierung von SLIT-MYC-TM aufgrund der Transmembrandomäne unterbleibt.

Die ektopische Expression mittels *rho-Gal4* zeigt keine Unterschiede in der Expression von SLIT-MYC und SLIT-MYC-TM. Beide Konstrukte werden einerseits in der ZNS-Mittellinie exprimiert. Andererseits findet man eine Expression auf Axonen und im PNS. Die axonale Expression ist in Überlagerungen mit ant-FASII-Färbungen eindeutig zu erkennen.

Nach ektopischer Expression von SLIT-MYC mittels *rho-Gal4* konnten zudem Defekte in der Entwicklung des embryonalen ZNS beobachtet werden. Dabei führte die ektopische Expression zu einer schwachen Phänokopie der *robo*-Mutante. Die beobachteten Defekte können auf eine Störung der axonalen Repulsion zurückgeführt werden. Auch nach ektopischer Expression von NETRIN kann eine Phänokopie des Genverlustes erzeugt werden (Harris et al., 1996b; Mitchell et al., 1996). Dies zeigt einen ähnlichen Effekt in der Überexpression der beiden Signalmoleküle. Kidd et. al. (1999) postulieren, daß die gleichmäßige Expression von Signalmolekülen einen ähnlichen Effekt zeigt wie der Genverlust. Die genaue lokale Verteilung des Signals ist dabei von entscheidender Bedeutung. So stört eine Erhöhung des SLIT-Signals im ZNS vermutlich die Verteilung des endogenen Proteins, was in den beobachteten Defekten resultiert.

Die ektopische Expression von SLIT-MYC-TM hingegen hat keinen Einfluß auf die Entwicklung des ZNS. Weder eine panneurale Expression noch eine Expression in der Mittellinie resultiert in einem abnormen ZNS-Phänotyp. Dies kann einerseits auf eine zu geringe Dosis zurückgeführt werden. Da für SLIT-MYC erst nach einer Erhöhung der Dosis ein Defekt beobachtet werden konnte, ist dies auch für SLIT-MYC-TM zu erwarten. Andererseits kann auch die transmembrane Bindung und die damit verbundene Blockierung der Sezernierung für die fehlenden Phänotypen verantwortlich sein. Dies muß allerdings noch genauer untersucht werden.

#### **4.2.1.2.3. Embryonale Überexpression mittels *slit*-Gal4 und *sim*-Gal4**

Anschließend wurden die SLIT-Konstrukte mittels *sim*-Gal4 und *slit*-Gal4 in der ZNS-Mittellinie exprimiert. Bei einer Expression der SLIT-Konstrukte im Bereich der endogenen SLIT-Expression ist besonders darauf zu achten inwieweit sich die Verteilung von SLIT und MYC unterscheiden. In den Mittellinienzellen ist zu erwarten, daß eine Prozessierung des SLIT-Signals erfolgt. Daher ist zu vermuten, daß sich die Expression der beiden Marker unterscheidet.

Zunächst wurden die SLIT-Konstrukte im Muster der *sim*-Gal4 Treiberlinie exprimiert. Nach ektopischer Expression von SLIT-MYC zeigt sich im embryonalen ZNS eine Kolokalisation des MYC- und SLIT-Signals in den Mittellinienzellen. Zudem ist eine deutliche axonale Expression beider Signale in lateralen Bereichen des ZNS zu beobachten. Die laterale Verteilung des ektopischen SLIT-MYC-Proteins zeigt für beide Epitope allerdings keine Unterschiede. Dies deutet darauf hin, daß das vollständige Protein sezerniert wird. Auch die Expression in den Zellen der Mittellinie zeigt keinen deutlichen Unterschied in der Verteilung der beiden Signale. Das ektopisch exprimierte SLIT-MYC-Protein scheint somit im Embryo nicht proteolytisch prozessiert zu werden.

Eine SLIT-MYC-TM- Expression im Muster der *sim*-Gal4 Treiberlinie führt ebenfalls zu einer deutlichen Expression in der ZNS-Mittellinie. Der Vergleich des MYC- und des SLIT-Signals zeigt hier einen Unterschied in der Intensität. So scheint das MYC-Signal in der Mittellinie deutlich stärker exprimiert zu sein. Die SLIT-Expression beschränkt sich auf bestimmte Bereiche der Mittellinienzellen, wohingegen eine MYC-Expression in der gesamten Zelle detektiert werden kann. Auch nach einer ektopischen Expression im *sim*-Gal4 Muster von SLIT-MYC-TM findet sich eine Verteilung der

beiden Signale auf Axonen des ZNS. Diese axonale Expression von SLIT-MYC-TM fällt im Vergleich zur Expression von SLIT-MYC jedoch deutlich schwächer aus. Allerdings zeigt auch hier die laterale Expression für die beiden Epitope keinen Unterschied. Somit kann für SLIT-MYC-TM ebenfalls angenommen werden, daß das ektopisch exprimierte Protein nicht prozessiert wird.

Neben einer Expression im *sim*-Gal4 Muster wurde SLIT-MYC außerdem mittels *slit*-Gal4 ektopisch exprimiert. Diese Expression von SLIT-MYC resultiert in einer deutlichen Expression der beiden Epitope in Mittellinienzellen. Dabei ist eine Kolo-kalisation des MYC- und SLIT-Signals zu beobachten. Außerhalb der Mittellinie findet sich nach der ektopischen Expression von SLIT-MYC mittels *slit*-Gal4 lediglich eine schwache Expression. Zudem zeigen beide Marker eine gleich starke Expression in lateralen Bereichen des ZNS. Dies deutet ebenfalls darauf hin, daß das ektopisch exprimierte Protein nicht prozessiert wird.

Die ektopische Expression der SLIT-Konstrukte in der ZNS-Mittellinie konnte keine Prozessierung der ektopischen Proteine nachweisen. Rettungsexperimente hingegen deuten darauf hin, daß SLIT-MYC-TM nach einer Expression in der Mittellinie proteolytisch gespalten wird. In den Western-Blot-Analysen der wildtypischen SLIT-Expression wurde gezeigt, daß im Embryo die Proteinmenge von prozessiertem SLIT deutlich geringer ist als die Menge des vollständigen Proteins. Somit wäre denkbar, daß prozessiertes SLIT in Antikörperfärbungen am *whole mount* Embryo nicht detektiert werden kann. Dies würde die Diskrepanz der Ergebnisse erklären. Für eine genaue Analyse der möglichen Prozessierung des ektopisch exprimierten Proteins sind allerdings weitere Western-Blot-Analysen unbedingt erforderlich.

#### **4.2.1.2.4. Ektopische Expression in der Flügelimaginalscheibe**

Neben der ektopischen Expression der SLIT-Konstrukte im *Drosophila*-Embryo wurden die Konstrukte zusätzlich in der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Das zweischichtige Epithel erlaubt dabei eine genauere Aussage über die subzelluläre Verteilung des ektopisch exprimierten Proteins. Die Expression erfolgte mittels *en*-Gal4 und ermöglichte eine Expression im kompletten posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe.

Die Analyse der SLIT-MYC Expression und der Vergleich mit SLIT-MYC-TM wies nach, daß SLIT-MYC auch in der Flügelimaginalscheibe sezerniert wird. So ist nach der

ektopischen Expression eine punktierte Verteilung des Proteins außerhalb der *en-Gal4*-Expressionsdomäne zu erkennen. Diese punktierte Expression ist für SLIT-MYC-TM nicht nachweisbar. SLIT-MYC-TM wird somit auch in der Flügelimaginalscheibe nicht sezerniert.

Eine 3D-Rekonstruktion der Flügelimaginalscheiben nach ektopischer SLIT-MYC Expression konnte zeigen, daß es sich bei der punktierten Expression um kleine intrazelluläre Strukturen handelt. Diese Strukturen könnten beispielsweise Vesikel sein. Auch im Embryo konnte eine punktierte Expression nachgewiesen werden, die an Vesikel erinnert.

#### **4.2.2. Vesikuläre SLIT-Expression**

Obwohl ein Beweis der vesikulären Expression von endogenem SLIT noch aussteht, geben die Ergebnisse erste Anhaltspunkte über eine mögliche Verteilung des Proteins. Für sezernierte Signalmoleküle der axonalen Wegfindung konnten in *Drosophila* bisher keine Modelle für die graduelle Expression erstellt, bzw. durch Daten belegt werden. Allerdings konnten in *Drosophila* für eine weitere Proteinklasse, für deren biologische Funktionalität die graduelle Proteinverteilung ebenfalls essentiell ist, verschiedene Modelle der Gradienten-Bildung und -Funktion erstellt werden. Dabei handelt es sich um Morphogene. In *Drosophila* konnte für die Morphogene DECAPENTAPLEGIC (*Dpp*), HEDGEHOG (*Hh*) und WINGLESS (*Wg*) eine graduelle Verteilung nachgewiesen werden (Strigini and Cohen, 1999). Zudem geben neue Studien immer mehr Einblicke in die Funktionsweise und Regulierung der Morphogengradienten. Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß die Verteilung einiger Morphogene vermutlich über Transcytose erfolgt. Zudem wurde die Bedeutung von Heparan-Sulfat-Proteoglycanen (HSPG) in der Verteilung und Funktion von Morphogenen nachgewiesen.

Für die DPP-Sezernierung wurde zunächst postuliert, daß das Protein von den exprimierenden Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert wird und sich durch eine freie Diffusion ausbreitet (Podos and Ferguson, 1999). Neuere Studien zeigen hingegen eine vesikuläre Verteilung des Morphogens. So konnte gezeigt werden, daß der DPP- Gradient in der Flügelimaginalscheibe durch endocytotische Proteine reguliert wird (Entchev and Gonzalez-Gaitan, 2002). Zudem zeigen neue Experimente eine Kolokalisation von DPP mit verschiedenen endocytotischen



Markern, Proteinen der RAB-Familie (Pantazis P., persönliche Kommunikation). Die RAB-Proteine gehören zur Familie der kleinen G-Proteine, sie sind evolutionär hoch konserviert und haben eine Funktion in der Endo- und Exocytose der Zelle (Zerial and McBride, 2001).

Für andere Morphogene wurde ein weiteres Modell der Gradientenbildung postuliert. So wird WINGLESS in der Flügelimaginalscheibe in Vesikel ähnlichen Strukturen, den sogenannten Argosomen, exprimiert. Argosomen sind Membran-Fragmente die zunächst im Epithel der Flügelimaginalscheibe nachgewiesen wurden. Es konnte gezeigt werden, daß Morphogene über Argosomen durchs Epithel wandern und so einen Gradienten ausbilden (Greco et al., 2001). Auch im Embryo konnten Argosomen nachgewiesen werden. Zudem weisen erste Ergebnisse auf eine Bedeutung der Glypicane DALLY und DALLY-LIKE in der Argosomenbildung hin (Eaton S., persönliche Kommunikation).

Für HSPGs konnte zudem die Bedeutung in der Funktion und Verteilung weiterer Morphogene nachgewiesen werden. So wurde für DALLY eine zellautonome Funktion im DPP-Signalweg, beispielsweise durch Stabilisierung des Proteins als Corezeptor, und eine nicht zellautonome Funktion in der Regulierung des DPP Gradienten beschrieben (Fujise et al., 2003). DALLY und DALLY-LIKE haben außerdem eine Bedeutung in der Verteilung des Morphogens HEDGEHOG. So konnte gezeigt werden, daß die Sezernierung nicht durch eine freie Diffusion sondern durch eine Bewegung von Zelle zu Zelle erfolgt (Han et al., 2004). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß HEDGEHOG auf der Zelloberfläche, und nicht durch Endocytose, von Zelle zu Zelle gegeben wird. In diesem Prozeß scheinen die Zelloberflächen-HSPGs DALLY und DALLY-LIKE eine bedeutende Rolle zu spielen.

Eine Bedeutung von HSPGs in der Funktion und Verteilung von Morphogenen wurde in *Drosophila* bis jetzt nur in der Flügelimaginalscheibe analysiert. Für TOUT-VELU, eine Glycosyl-Transferase, konnte eine Bedeutung in der Regulierung der HEDGEHOG-Sezernierung im Embryo nachgewiesen werden (The et al., 1999). Glycosyl-Transferasen spielen eine bedeutende Rolle in der Synthese von Heparan-Sulfat-Seitenketten. Weitere Studien konnten zeigen das Dally und Dally-like das Substrat von TOUT-VELU sind (Han et al., 2004). Auch in Vertebraten wurde für HSPGs eine Funktion in der Gradientenbildung von Morphogenen beschrieben (Paine-Saunders et al., 2002).

Die ektopische Expression von SLIT deutet darauf hin, daß auch SLIT vesikulär exprimiert wird. Zudem zeigte die Analyse von HSPG Mutaten, daß diese auch eine

Bedeutung in der Signalwirkung von SLIT haben. Daher wäre für SLIT eine ähnliche Funktion wie für die erwähnten Morphogene denkbar. So erinnert die Expression von SLIT-MYC in der Flügelimaginalscheibe an Argosomen.

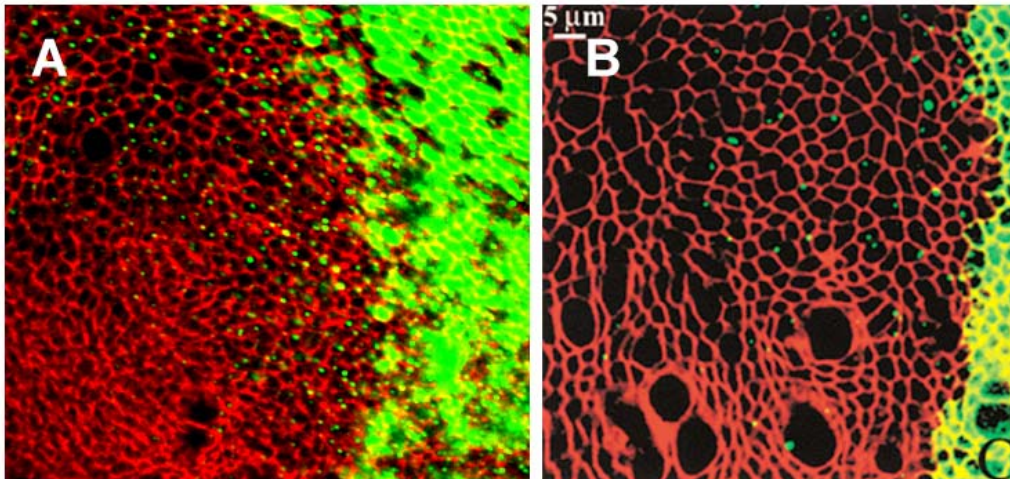


Abb. 55 Vergleich der SLIT-MYC-Expression mit Literaturdaten

(A) Expression von SLIT-MYC in der Flügelimaginalscheibe; Expression von Myc (grün); anti-DISCS-LARGE markiert die Zellgrenzen der Imaginalscheibe (rot); (B) Argosomen in der Flügelimaginalscheibe (Greco et al., 2001).

Um eine vesikuläre Expression von SLIT nachzuweisen, wurde damit begonnen Doppelfärbungen mit anti-SLIT und endocytotischen Markern durchzuführen. Dabei wurden Antikörper gegen RAB4, RAB5, RAB7 und RAB11 verwendet. Erste Voruntersuchungen ergaben kein Ergebnis, da die *Drosophila* anti-RAB Antikörper nicht einwandfrei im Embryo funktionieren. Weitere Analysen stehen somit noch aus.

#### 4.2.3. Matrix-Metallo-Proteasen

Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) sind aktiv an der Modellierung der ECM beteiligt, da sie nahezu alle Proteine der ECM proteolytisch spalten können. In Vertebraten sind über 20 MMPs bekannt, wobei die Rolle in der Embryonalentwicklung und die Physiologie der Proteine noch unklar ist. So überleben viele MMP Knock-outs in der Maus die Embryogenese (McCawley and Matrisian, 2001; Sternlicht and Werb, 2001). Im *Drosophila*-Genom finden sich lediglich zwei MMPs, MMP1 und MMP2.

Zudem findet sich ein Protein der TIMP-Familie (Tissue Inhibitor of Metalloproteases) (Page-McCaw et al., 2003). Der Ausfall der MMPs sowie von TIMP hat in *Drosophila* keinen Einfluß auf die Embryonalentwicklung. Die mutanten Tiere überleben die Embryogenese und der Verlust der MMP-Genfunktion führt erst in der Larve zur Lethalität (Page-McCaw et al., 2003).

Allerdings findet sich im embryonalen ZNS von *Drosophila* eine deutliche Expression der MMPs in der ZNS-Mittellinie. Die Rolle der MMPs im ZNS ist bisher nicht bekannt und ein Genverlust führt zu keinerlei Defekten im ZNS. Wie gezeigt wird SLIT proteolytisch prozessiert, wobei die verantwortliche Protease noch nicht identifiziert werden konnte. Ein möglicher Kandidat in *Drosophila* ist KUZBANIAN, eine Metalloprotease der ADAMS-Familie, die genetisch mit SLIT interagiert (Schimmelpfeng et al., 2001). Zudem weisen weitere Untersuchungen in Vertebraten auf eine Beteiligung von Metalloproteasen in einigen Signalwegen der axonalen Wegfindung hin (McFarlane, 2003). So wäre denkbar, daß auch *Drosophila* MMPs eine Rolle in der Prozessierung von Signalmolekülen im ZNS spielen. Daher wurde untersucht ob die ektopische Expression der MMPs im embryonalen ZNS zu Defekten führt.

Lediglich die ektopische Expression von MMP1 führt im embryonalen ZNS zu massiven Defekten in der Embryogenese. Dabei erinnern diese Defekte an den Verlust von NETRIN. Der Verlust der *netrin*-Genfunktion führt im embryonalen ZNS zum Verlust der Kommissuren und zu Wachstumsdefekten der Konnektive (4.3). Defekte die an den Verlust der *slit*-Genfunktion erinnern konnten nicht beobachtet werden. Somit ist auszuschließen, daß MMP1 eine Rolle in der Prozessierung von SLIT spielt. Allerdings weisen die Ergebnisse auf eine mögliche Prozessierung der NETRINE oder deren Rezeptoren hin. So konnte in Vertebraten nachgewiesen werden, daß der NETRIN-Rezeptor DCC proteolytisch prozessiert wird (Galko and Tessier-Lavigne, 2000).

### 4.3. NETRIN

Wie für *Drosophila* und andere Organismen gezeigt wurde, vermitteln die NETRINE eine attraktive Wirkung für kommissurale Axone (Harris et al., 1996a; Hedgecock et al., 1990; Kennedy et al., 1994; Mitchell et al., 1996; Serafini et al., 1994). In *Drosophila* führt der Ausfall der beiden NETRINE A und B zu deutlichen Defekten im embryonalen ZNS. Diese Defekte machen sich im nahezu kompletten Verlust der Kommissuren bemerkbar. Der beobachtete Phänotyp kann auf den Ausfall der NETRINE zurückgeführt werden, da eine ektopische Expression der NETRINE im defizienten Hintergrund zu einer Rettung des Ausfall-Phänotyps führt (Harris et al., 1996b; Mitchell et al., 1996). Die NETRINE werden von ZNS-Mittellinienzellen sezerniert und wirken auf kommissurale Axone. In Vertebraten konnte eine "long-range" Funktion des NETRIN-Signals nachgewiesen werden (Serafini et al., 1994). Für *Drosophila* steht allerdings ein ähnlicher Beweis noch aus. So sollte in dieser Arbeit zum einen geklärt werden, ob für die biologische Funktionalität des NETRIN-Signals eine Sezernierung des Proteins von Nöten ist. Zum anderen wurde analysiert, ob die ektopische Expression eines modifizierten NETRIN-Proteins einen Einfluß auf die Entwicklung des embryonalen ZNS hat.

#### 4.3.1. Ektopische Expression von NETA-TM

Um die Notwendigkeit und Bedeutung der Sezernierung des NETRIN-Proteins zu untersuchen wurde ein transmembrangebundenes NETRINA-Protein (NETA-TM) generiert. Nach ektopischer Expression von NETA-TM sollte eine Sezernierung des Proteins unterbleiben.

Die ektopische Expression von NETRIN im embryonalen ZNS führt zu einer Phänokopie des Genverlustes. Nach panneuraler Expression ist in einigen Neuromeren ein Verlust der Kommissuren zu beobachten. Die Analyse des embryonalen ZNS nach einer ektopischen Expression des NETA-TM Konstruktes zeigt ebenfalls Defekte in der Entwicklung des ZNS. Eine Auszählung der beobachteten Defekte nach ektopischer NETA-TM Expression ergab, daß die ektopische Expression nicht mit hundertprozentiger Penetranz zu einem abnormen ZNS Phänotyp führt. Diese Variabilität kann allerdings auf das UAS/Gal4-System zurückgeführt werden.

In frühen Entwicklungsstadien ist zu beobachten, daß eine ektopische Expression von NETA-TM in der ZNS-Mittellinie zu einer Akkumulation von Axonen an der ZNS-Mittellinie führt. Zudem ist in anti-FASII-Färbungen zu erkennen, daß Axone auf die Mittellinie zuwachsen, die im Wildtyp in longitudinaler Richtung projizieren und diese nicht kreuzen. Der Phänotyp zeigt, daß mehr Axone als im Wildtyp auf die Mittellinie zuwachsen. Zudem erwecken die frühen Phänotypen den Eindruck, daß Axone die auf die Mittellinie zuwachsen dort verbleiben. Der Phänotyp könnte durch eine starke Bindung von NET-TM an FRAZZLED erklärt werden. So wurde in *Drosophila* gezeigt, daß FRAZZLED neben der Vermittlung der attraktiven Wirkung auch für eine Weitergabe von NETRIN verantwortlich ist. Durch eine starke Bindung des NETRIN-Signals wird dieses von FRAZZLED noch unbekanntem NETRIN-Rezeptoren präsentiert (Hiramoto et al., 2000). So wäre es denkbar, daß NETA-TM in den Zellen der ZNS-Mittellinie transmembran gebunden bleibt und wandernde Axone durch eine Bindung von FRAZZLED an NETA-TM in der Mittellinie verbleiben. Für EPHRINE, ein repulsives Signalmolekül der axonalen Wegfindung, konnte in Vertebraten ein ähnliches Prinzip beschrieben werden. EPHRINE bleiben an der Membran gebunden und erst nach der Bindung an den EPH-Rezeptor erfolgt eine proteolytische Spaltung und der EPHRIN-EPH-Komplex wird frei. Durch eine Blockierung der Proteolyse von EPHRIN unterbleibt die Prozessierung und die axonale Repulsion wird verzögert (Hattori et al., 2000). Die Defekte in der frühen Entwicklung des ZNS werden anscheinend mit der Zeit aufgehoben. Die Phänotypen nach ektopischer NETA-TM-Expression in späteren Entwicklungsstadien sind vergleichsweise schwächer. Zwar zeigt sich auch dort ein deutlicher ZNS-Phänotyp. So ist in späteren Entwicklungsstadien eine leichte Fusion der Kommissuren nach ektopischer NETA-TM-Expression zu erkennen. Die Fusion der Kommissuren deutet darauf hin, daß die kommissuralen Axone unorganisierter als in der wildtypischen Situation die ZNS-Mittellinie kreuzen. Allerdings sind keine Hinweise auf ein Verbleiben der Axone in der Mittellinie zu erkennen.

#### **4.3.1.1. Ektopische NETA-TM-Expression im Hintergrund der Defizienz *Df(1)KA 9***

Die Notwendigkeit einer Sezernierung für die biologische Funktionalität von NETRIN konnte anhand von Rettungsexperimenten geklärt werden. Die ektopische Expression von NETRINA und B im defizienten Hintergrund ist in der Lage den

Ausfall-Phänotyp zu retten (Harris et al., 1996a; Mitchell et al., 1996). Im Gegensatz dazu führt eine ektopische Expression von NETA-TM zu keiner Rettung. Dies zeigt die Notwendigkeit einer Sezernierung des Proteins. Daher ist anzunehmen, daß NETRIN somit auch in *Drosophila* sezerniert wird und einen Gradienten ausbildet. Um diesen postulierten Gradienten zu untersuchen, sind allerdings weitere Experimente erforderlich. So ist ein Nachweis der Membranbindung von NetA-TM sowie eine Visualisierung des Gradienten essentiell.

Daher wurde ein weiteres modifiziertes NETRIN-Konstrukt generiert. Durch das Einfügen zweier Protein-Epitope in das NetA-TM-Konstrukt konnte ein Epitop markiertes NetA-TM-Konstrukt erstellt werden. Die Epitop Markierung war erforderlich, da kein NETRINA Antikörper zur Verfügung steht. Allerdings war ein einsprechendes Konstrukt nicht funktional. Die Sequenzierungen bestätigten die korrekte Klonierung des Konstruktes, es konnte allerdings weder in Zellkultur noch nach Keimbahntransformation im *Drosophila* Embryo exprimiert werden.

## 5. Zusammenfassung

In der Entwicklung zentraler Nervensysteme spielen sezernierte Signalmoleküle eine entscheidende Rolle. Den wandernden Axonen dienen sie als Informationen, an denen sich der Wachstumskegeln orientiert und mit deren Hilfe er seinen Weg findet. In der vorliegenden Arbeit wurden die sezernierten Signalmoleküle SLIT und NETRIN untersucht.

SLIT wirkt in der Entwicklung des embryonalen ZNS als repulsives Signal auf ZNS-Axone und der Verlust der *slit*-Genfunktion führt zum Kollaps der Axone an der ZNS-Mittellinie. Das SLIT-Protein wird in Mittelliniengliazellen exprimiert und viele Literaturdaten weisen auf eine Sezernierung von SLIT hin. Bisher konnte allerdings nicht gezeigt werden wie die Sezernierung des Proteins erfolgt.

Mit Hilfe verschiedener SLIT-Konstrukte konnte *in vivo* ein erster Hinweis erbracht werden, wie das SLIT-Protein sezerniert wird. So weisen die Ergebnisse auf eine vesikuläre Expression von SLIT hin. Der Vergleich mit Literaturdaten legt einen ähnlichen Mechanismus für die SLIT-Sezernierung nahe, wie er bereits für einige Morphogene nachgewiesen wurde.

Auch das attraktive Signalmolekül NETRIN wird im ZNS von Mittellinienzellen exprimiert. Für die biologische Funktionalität wird eine Sezernierung des Proteins postuliert. In *Drosophila* konnte allerdings bisher kein Beweis erbracht werden, der eine Sezernierung des Proteins belegt.

Mittels eines transmembrangebundenen NETRIN-Konstruktes wurde gezeigt, daß eine Sezernierung von NETRIN für die biologische Funktionalität essentiell ist. Ein transmembrangebundenes NETRIN-Konstrukt war nicht in der Lage den Ausfallphänotyp einer *netrin*-Defizienz zu retten.

Die Analyse der Bedeutung von ECM-Komponenten in der axonalen Wegfindung zeigt, daß die ECM für die Verteilung von Signalmolekülen anscheinend keine große Bedeutung hat. Lediglich einige Integrine und Heparan-Sulfat-Proteoglycane scheinen in der Funktion des SLIT-Signals eine Rolle zu spielen.

## 6. Literatur

- Adams, J. C. and Watt, F. M.** (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**, 1183-98.
- Akita, K., Toda, M., Hosoki, Y., Inoue, M., Fushiki, S., Oohira, A., Okayama, M., Yamashina, I. and Nakada, H.** (2004). Heparan sulfate proteoglycans interact with neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Biochem J Pt.*
- Anderson, R. B., Cooper, H. M., Jackson, S. C., Seaman, C. and Key, B.** (2000). DCC plays a role in navigation of forebrain axons across the ventral midbrain commissure in embryonic xenopus. *Dev Biol* **217**, 244-53.
- Anderson, R. B. and Holt, C. E.** (2002). Expression of UNC-5 in the developing *Xenopus* visual system. *Mech Dev* **118**, 157-60.
- Barrett, C. and Guthrie, S.** (2001). Expression patterns of the netrin receptor UNC5H1 among developing motor neurons in the embryonic rat hindbrain. *Mech Dev* **106**, 163-6.
- Bashaw, G. J. and Goodman, C. S.** (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* **97**, 917-26.
- Battye, R., Stevens, A., Perry, R. L. and Jacobs, J. R.** (2001). Repellent signaling by Slit requires the leucine-rich repeats. *J Neurosci* **21**, 4290-8.
- Baumgartner, S. and Chiquet-Ehrismann, R.** (1993). Tena, a *Drosophila* gene related to tenascin, shows selective transcript localization. *Mech Dev* **40**, 165-76.
- Baumgartner, S., Martin, D., Hagios, C. and Chiquet-Ehrismann, R.** (1994). Tenm, a *Drosophila* gene related to tenascin, is a new pair-rule gene. *Embo J* **13**, 3728-40.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M.** (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**, 729-77.
- Bokel, C. and Brown, N. H.** (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell* **3**, 311-21.
- Borchiellini, C., Coulon, J. and Le Parco, Y.** (1996). The function of type IV collagen during *Drosophila* muscle development. *Mech Dev* **58**, 179-91.
- Bossing, T. and Brand, A. H.** (2002). Dephrin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **129**, 4205-18.
- Bossing, T. and Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labeling. *Development* **120**, 1895-1906.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41-64.



- Brabant, M. C. and Brower, D. L.** (1993). PS2 integrin requirements in *Drosophila* embryo and wing morphogenesis. *Dev Biol* **157**, 49-59.
- Brabant, M. C., Fristrom, D., Bunch, T. A. and Brower, D. L.** (1996). Distinct spatial and temporal functions for PS integrins during *Drosophila* wing morphogenesis. *Development* **122**, 3307-17.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T.** (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.
- Brower, D. L., Brabant, M. C. and Bunch, T. A.** (1995). Role of the PS integrins in *Drosophila* development. *Immunol Cell Biol* **73**, 558-64.
- Brown, N. H.** (1993). Integrins hold *Drosophila* together. *Bioessays* **15**, 383-90.
- Brown, N. H., Gregory, S. L. and Martin-Bermudo, M. D.** (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **223**, 1-16.
- Bulow, H. E. and Hobert, O.** (2004). Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron* **41**, 723-36.
- Bunch, T. A. and Brower, D. L.** (1992). *Drosophila* PS2 integrin mediates RGD dependent cell matrix interactions. *Development* **116**, 239-47.
- Bunch, T. A., Graner, M. W., Fessler, L. I., Fessler, J. H., Schneider, K. D., Kerschen, A., Choy, L. P., Burgess, B. W. and Brower, D. L.** (1998). The PS2 integrin ligand tigrin is required for proper muscle function in *Drosophila*. *Development* **125**, 1679-89.
- Callahan, C. A., Muralidhar, M. G., Lundgren, S. E., Scully, A. L. and Thomas, J. B.** (1995). Control of neuronal pathway selection by a *Drosophila* receptor protein tyrosine kinase family member. *Nature* **376**, 171-4.
- Campbell, A. G., Fessler, L. I., Salo, T. and Fessler, J. H.** (1987). Papilin: a *Drosophila* proteoglycan like sulfated glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* **262**, 17605-12.
- Campbell, D. S. and Holt, C. E.** (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* **32**, 1013-26.
- Campos-Ortega, J. A.** (1993). Early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. In *Development of Drosophila*, vol. 2 (ed. C. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1091-1129: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Carthew, R. W.** (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 244-8.

- Chan, S. S., Zheng, H., Su, M. W., Wilk, R., Killeen, M. T., Hedgecock, E. M. and Culotti, J. G.** (1996). UNC 40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC 6 netrin cues. *Cell* **87**, 187-95.
- Crews, S. T., Thomas, J. B. and Goodman, C. S.** (1988). The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* **52**, 143-151.
- de la Torre, J. R., Hopker, V. H., Ming, G. L., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A. and Holt, C. E.** (1997). Turning of retinal growth cones in a netrin 1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* **19**, 1211-24.
- Deiner, M. S., Kennedy, T. E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M. and Sretavan, D. W.** (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* **19**, 575-89.
- Deiner, M. S. and Sretavan, D. W.** (1999). Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. *J Neurosci* **19**, 9900-12.
- Desbordes, S. C. and Sanson, B.** (2003). The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* **130**, 6245-55.
- Dickson, B. J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-64.
- Digan, M. E., Haynes, S. R., Mozer, B. A., Dawid, I. B., Forquignon, F. and Gans, M.** (1986). Genetic and molecular analysis of fs(1)h, a maternal effect homeotic gene in *Drosophila*. *Dev Biol* **114**, 161-9.
- Drysdale, R., Warmke, J., Kreber, R. and Ganetzky, B.** (1991). Molecular characterization of eag: a gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **127**, 497-505.
- Dunin-Borkowski, O. M. and Brown, N. H.** (1995). Mammalian CD2 is an effective heterologous marker of the cell surface in *Drosophila*. *Developmental Biology* **168**, 689-693.
- Englund, C., Steneberg, P., Falileeva, L., Xylourgidis, N. and Samakovlis, C.** (2002). Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the *Drosophila* trachea. *Development* **129**, 4941-51.
- Entchev, E. V. and Gonzalez-Gaitan, M. A.** (2002). Morphogen gradient formation and vesicular trafficking. *Traffic* **3**, 98-109.
- Erskine, L., Williams, S. E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R. A., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Mason, C. A.** (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robo and slits. *J Neurosci* **20**, 4975-82.
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H. et al.** (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386**, 796-804.
- Felsenfeld, D. P., Choquet, D. and Sheetz, M. P.** (1996). Ligand binding regulates the directed movement of beta1 integrins on fibroblasts. *Nature* **383**, 438-40.

- Fessler, L. I., Nelson, R. E. and Fessler, J. H.** (1994). Drosophila extracellular matrix. *Methods Enzymol* **245**, 271-94.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Fogerty, F. J., Fessler, L. I., Bunch, T. A., Yaron, Y., Parker, C. G., Nelson, R. E., Brower, D. L., Gullberg, D. and Fessler, J. H.** (1994). Tiggrin, a novel Drosophila extracellular matrix protein that functions as a ligand for Drosophila alpha PS2 beta PS integrins. *Development* **120**, 1747-58.
- Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M. and Mehlen, P.** (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* **417**, 443-7.
- Fricke, C., Lee, J. S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F. and Chien, C. B.** (2001). astray, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. *Science* **292**, 507-10.
- Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S. and Nakato, H.** (2003). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the Drosophila wing. *Development* **130**, 1515-22.
- Fujita, S. C., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A. and Shotwell, S. L.** (1982). Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7929-33.
- Galko, M. J. and Tessier-Lavigne, M.** (2000). Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* **289**, 1365-7.
- Garcia-Alonso, L., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996). Genetic analysis of Laminin A in Drosophila: extracellular matrix containing laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* **122**, 2611-21.
- Garrison, K., MacKrell, A. J. and Fessler, J. H.** (1991). Drosophila laminin A chain sequence, interspecies comparison, and domain structure of a major carboxyl portion. *J Biol Chem* **266**, 22899-904.
- Gellon, G., Harding, K. W., McGinnis, N., Martin, M. M. and McGinnis, W.** (1997). A genetic screen for modifiers of Deformed homeotic function identifies novel genes required for head development. *Development* **124**, 3321-31.
- Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E.** (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.
- Gitai, Z., Yu, T. W., Lundquist, E. A., Tessier-Lavigne, M. and Bargmann, C. I.** (2003). The netrin receptor UNC-40/DCC stimulates axon attraction and outgrowth through enabled and, in parallel, Rac and UNC-115/AbLIM. *Neuron* **37**, 53-65.
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q.** (1993). Embryonic development of the Drosophila central nervous system: CSH press.
- Gotwals, P. J., Paine-Saunders, S. E., Stark, K. A. and Hynes, R. O.** (1994). Drosophila integrins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 734-9.
- Greco, V., Hannus, M. and Eaton, S.** (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* **106**, 633-45.
- Gullberg, D. and Ekblom, P.** (1995). Extracellular matrix and its receptors during development. *Int J Dev Biol* **39**, 845-54.

- Hamelin, M., Zhou, Y., Su, M. W., Scott, I. M. and Culotti, J. G.** (1993). Expression of the unc-5 guidance receptor in the touch neurons of *C.elegans* steers their axons dorsally. *Nature* **364**, 327-330.
- Han, C., Belenkaya, T. Y., Wang, B. and Lin, X.** (2004). *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* **131**, 601-11.
- Hao, J. C., Yu, T. W., Fujisawa, K., Culotti, J. G., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Moulder, G., Barstead, R., Tessier-Lavigne, M. and Bargmann, C. I.** (2001). *C. elegans* slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* **32**, 25-38.
- Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A.** (1996a). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* **17**, 217-28.
- Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A.** (1996b). Guidance cues at the *Drosophila* midline: Identification and characterization of two *Drosophila* netrin/unc6 homologs. *Neuron* **17**, 217-228.
- Hattori, M., Osterfield, M. and Flanagan, J. G.** (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* **289**, 1360-5.
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G. and Hall, D. H.** (1990). The unc-5, unc-6 and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* **4**, 61-85.
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Thomson, J. N. and Perkins, L. A.** (1985). Axonal guidance mutants of *Coenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev. Biol.* **111**, 158-170.
- Henchcliffe, C., Garcia-Alonso, L., Tang, J. and Goodman, C. S.** (1993). Genetic analysis of laminin A reveals diverse functions during morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **118**, 325-37.
- Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77-87.
- Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. and Hotta, Y.** (2000). The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* **406**, 886-9.
- Hoang, B. and Chiba, A.** (1998). Genetic analysis on the role of integrin during axon guidance in *Drosophila*. *J Neurosci* **18**, 7847-55.
- Holmes, G. and Niswander, L.** (2001). Expression of slit-2 and slit-3 during chick development. *Dev Dyn* **222**, 301-7.
- Holmes, G. P., Negus, K., Burridge, L., Raman, S., Algar, E., Yamada, T. and Little, M. H.** (1998). Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev* **79**, 57-72.
- Höpker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. and Holt, C.** (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* **401**, 69-73.

- Hsueh, Y. P. and Sheng, M.** (1999). Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci* **19**, 7415-25.
- Hu, H.** (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* **23**, 703-11.
- Hu, H.** (2001). Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat Neurosci* **4**, 695-701.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1997). Fast and efficient egg collection and antibody staining from large numbers of *Drosophila* strains. *DEG* **207**, 131-135.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila* : I Identification of the required gene functions. *Dev. Biol.* **209**, 381-398.
- Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G. and Hedgecock, E. M.** (1992). UNC 6, a laminin related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* **9**, 873-81.
- Itoh, A., Miyabayashi, T., Ohno, M. and Sakano, S.** (1998). Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **62**, 175-86.
- Jackson, S. M., Nakato, H., Sugiura, M., Jannuzi, A., Oakes, R., Kaluza, V., Golden, C. and Selleck, S. B.** (1997a). dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF beta related morphogen, Dpp. *Development* **124**, 4113-20.
- Jackson, S. M., Nakato, H., Sugiura, M., Jannuzi, A., Oakes, R., Kaluza, V., Golden, C. and Selleck, S. B.** (1997b). dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. *Development* **124**, 4113-20.
- Jacobs, J. R.** (2000). The midline glia of *Drosophila*: a molecular genetic model for the developmental functions of glia. *Prog Neurobiol* **62**, 475-508.
- Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1989). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J Neurosci* **9**, 2412-22.
- Johnson, K. G., Ghose, A., Epstein, E., Lincecum, J., O'Connor, M. B. and Van Vactor, D.** (2004). Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. *Curr Biol* **14**, 499-504.
- Kaprielian, Z., Runko, E. and Imondi, R.** (2001). Axon guidance at the midline choice point. *Dev Dyn* **221**, 154-81.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G. and Tessier-Lavigne, M.** (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87**, 175-85.
- Keleman, K. and Dickson, B. J.** (2001). Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* **32**, 605-17.

- Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L. A., Technau, G. M. and Dickson, B. J.** (2002). Comm sorts robo to control axon guidance at the Drosophila midline. *Cell* **110**, 415-27.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R. and Tessier-Lavigne, M.** (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425-35.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.
- Khare, N. and Baumgartner, S.** (2000). Dally-like protein, a new Drosophila glypican with expression overlapping with wingless. *Mech Dev* **99**, 199-202.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. *Cell* **96**, 785-94.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Tear, G.** (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**, 205-15.
- Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S. and Tear, G.** (1998b). Dosage sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* **20**, 25-33.
- Klämbt, C. and Goodman, C. S.** (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo. *Glia* **4**, 205-13.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1991). The midline of the Drosophila central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**, 801-15.
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197-204.
- Kramer, S. G., Kidd, T., Simpson, J. H. and Goodman, C. S.** (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* **292**, 737-40.
- Kusche-Gullberg, M., Garrison, K., MacKrell, A. J., Fessler, L. I. and Fessler, J. H.** (1992). Laminin A chain: expression during Drosophila development and genomic sequence. *Embo J* **11**, 4519-27.
- Laski, F. A., Lio, D., Rubin. and G.** (1986). Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *C* **44**, 7-19.
- Le Parco, Y., Cecchini, J. P., Knibiehler, B. and Mirre, C.** (1986a). Characterization and expression of collagen-like genes in Drosophila melanogaster. *Biol Cell* **56**, 217-26.
- Le Parco, Y., Knibiehler, B., Cecchini, J. P. and Mirre, C.** (1986b). Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during Drosophila melanogaster development. *Exp Cell Res* **163**, 405-12.
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W.** (2003). Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-9.

- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L. and Tessier-Lavigne, M.** (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* **386**, 833-8.
- Letourneau, P. C., Condic, M. L. and Snow, D. M.** (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J Neurosci* **14**, 915-28.
- Li, H. S., Chen, J. H., Wu, W., Fagaly, T., Zhou, L., Yuan, W., Dupuis, S., Jiang, Z. H., Nash, W., Gick, C. et al.** (1999). Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* **96**, 807-18.
- Liang, Y., Annan, R. S., Carr, S. A., Popp, S., Mevissen, M., Margolis, R. K. and Margolis, R. U.** (1999). Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *J Biol Chem* **274**, 17885-92.
- Lim, Y. S., Mallapur, S., Kao, G., Ren, X. C. and Wadsworth, W. G.** (1999). Netrin UNC 6 and the regulation of branching and extension of motoneuron axons from the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **19**, 7048-56.
- Lin, D. M., Fetter, R. D., Kopczynski, C., Grenningloh, G. and Goodman, C. S.** (1994). Genetic analysis of Fasciclin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* **13**, 1055-69.
- Lin, X. and Perrimon, N.** (1999). Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* **400**, 281-4.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. In *Academic Press, Inc.* (ed).
- Livingstone, M. S.** (1985). Genetic dissection of *Drosophila* adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5992-6.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E. and Mehlen, P.** (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* **20**, 2715-22.
- Llano, E., Pendas, A. M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T. B. and Lopez-Otin, C.** (2000). Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem* **275**, 35978-85.
- Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D. M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C. S. and Tessier-Lavigne, M.** (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* **42**, 213-23.
- Lüer, K., Urban, J., Klämbt, C. and Technau, G. M.** (1997). Induction of identified mesodermal cells by CNS midline progenitors in *Drosophila*. *Development* **124**, 2681-90.
- Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E. L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R. and Baumgartner, S.** (1999). wing blister, a new *Drosophila* laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J Cell Biol* **145**, 191-201.
- Martin-Bermudo, M. D., Dunin-Borkowski, O. M. and Brown, N. H.** (1997). Specificity of PS integrin function during embryogenesis resides in the alpha subunit extracellular domain. *Embo J* **16**, 4184-93.

- McCawley, L. J. and Matrisian, L. M.** (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* **13**, 534-40.
- McFarlane, S.** (2003). Metalloproteases: carving out a role in axon guidance. *Neuron* **37**, 559-62.
- Mehlen, P. and Mazelin, L.** (2003). The dependence receptors DCC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival. *Biol Cell* **95**, 425-36.
- Menne, T. V., Luer, K., Technau, G. M. and Klämbt, C.** (1997). CNS midline cells in *Drosophila* induce the differentiation of lateral neural cells. *Development* **124**, 4949-58.
- Ming, G. L., Song, H. J., Berninger, B., Holt, C. E., Tessier-Lavigne, M. and Poo, M. M.** (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* **19**, 1225-35.
- Mirre, C., Le Parco, Y. and Knibiehler, B.** (1992). Collagen IV is present in the developing CNS during *Drosophila* neurogenesis. *J Neurosci Res* **31**, 146-55.
- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J.** (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17**, 203-15.
- Montell, D. J. and Goodman, C. S.** (1989). *Drosophila* laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J Cell Biol* **109**, 2441-53.
- Nakato, H., Futch, T. A. and Selleck, S. B.** (1995). The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development* **121**, 3687-702.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S. and Crews, S. T.** (1990). The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* **63**, 63-75.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1991). The *Drosophila* single minded gene encodes a helix loop helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-67.
- Nguyen Ba-Charvet, K. T., Brose, K., Ma, L., Wang, K. H., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M. and Chedotal, A.** (2001). Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci* **21**, 4281-9.
- Nguyen Ba-Charvet, K. T., Brose, K., Marillat, V., Kidd, T., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C. and Chedotal, A.** (1999). Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* **22**, 463-73.
- Niclou, S. P., Jia, L. and Raper, J. A.** (2000). Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* **20**, 4962-74.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Sante, J. M. and Rubin, G. M.** (2003). *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* **4**, 95-106.



- Paine-Saunders, S., Viviano, B. L., Economides, A. N. and Saunders, S.** (2002). Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface: a potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients. *J Biol Chem* **277**, 2089-96.
- Perrimon, N. and Bernfield, M.** (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**, 725-8.
- Piper, M., Georgas, K., Yamada, T. and Little, M.** (2000). Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* **94**, 213-7.
- Piper, M. and Little, M.** (2003). Movement through Slits: cellular migration via the Slit family. *Bioessays* **25**, 32-8.
- Pires Neto, M. A., Braga-de-Souza, S. and Lent, R.** (1999). Extracellular matrix molecules play diverse roles in the growth and guidance of central nervous system axons. *Braz J Med Biol Res* **32**, 633-8.
- Podos, S. D. and Ferguson, E. L.** (1999). Morphogen gradients: new insights from DPP. *Trends Genet* **15**, 396-402.
- Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J. and Dickson, B. J.** (2000). Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* **28**, 767-77.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J.** (2000b). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* **103**, 1033-45.
- Ren, X. C., Kim, S., Fox, E., Hedgecock, E. M. and Wadsworth, W. G.** (1999). Role of netrin UNC-6 in patterning the longitudinal nerves of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* **39**, 107-18.
- Ringstedt, T., Braisted, J. E., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M. and O'Leary, D. D.** (2000). Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *J Neurosci* **20**, 4983-91.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K. and Engels, W. R.** (1988). A stable source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 6341-6351.
- Rodriguez, A., Zhou, Z., Tang, M. L., Meller, S., Chen, J., Bellen, H. and Kimbrell, D. A.** (1996). Identification of immune system and response genes, and novel mutations causing melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **143**, 929-40.
- Ronca, F., Andersen, J. S., Paech, V. and Margolis, R. U.** (2001). Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem* **276**, 29141-7.
- Roote, C. E. and Zusman, S.** (1995). Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in *Drosophila*. *Dev Biol* **169**, 322-36.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansong, W. et al.** (1998). Systematic gain of function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-57.

- Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* **55**, 1047-59.
- Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* **4**, 2169-87.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15.
- Schimmelpfeng, K., Gogel, S. and Klämbt, C.** (2001a). The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech Dev* **106**, 25-36.
- Schimmelpfeng, K., Gogel, S. and Klämbt, C.** (2001b). The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech Dev* **106**, 25-36.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A. and Klämbt, C.** (1997). Control of midline glia development in the embryonic *Drosophila* CNS. *Mech Dev* **64**, 137-51.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* **17**, 641-54.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D. and Goodman, C. S.** (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**, 409-26.
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C. and Tessier-Lavigne, M.** (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87**, 1001-14.
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M. and Tessier-Lavigne, M.** (1994). The netrins define a family of axon outgrowth promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC 6. *Cell* **78**, 409-424.
- Shannon, M. P., Kaufman, T. C., Shen, M. W. and Judd, B. H.** (1972). Lethality patterns and morphology of selected lethal and semi-lethal mutations in the zeste-white region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**, 615-38.
- Sheppard, D.** (2000). In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol* **19**, 203-9.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (2000). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* **103**, 1019-32.

- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (2000b). Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* **28**, 753-66.
- Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S. and Rubin, G. M.** (1999). The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. *Genetics* **153**, 135-77.
- Spring, J., Paine-Saunders, S. E., Hynes, R. O. and Bernfield, M.** (1994). Drosophila syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3334-8.
- Stark, K. A., Yee, G. H., Roote, C. E., Williams, E. L., Zusman, S. and Hynes, R. O.** (1997). A novel alpha integrin subunit associates with betaPS and functions in tissue morphogenesis and movement during Drosophila development. *Development* **124**, 4583-94.
- Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jackle, H. and Vorbruggen, G.** (2004). Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr Biol* **14**, 225-30.
- Stein, E. and Tessier-Lavigne, M.** (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-38.
- Sternlicht, M. D. and Werb, Z.** (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463-516.
- Stevens, A. and Jacobs, J. R.** (2002). Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *J Neurosci* **22**, 4448-55.
- Strahle, U., Fischer, N. and Blader, P.** (1997). Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. *Mech Dev* **62**, 147-60.
- Strigini, M. and Cohen, S. M.** (1999). Formation of morphogen gradients in the Drosophila wing. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 335-44.
- Takagi, Y., Ui-Tei, K. and Hirohashi, S.** (2000). Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of enabled in Drosophila neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 482-7.
- Takagi, Y., Ui-Tei, K., Miyake, T. and Hirohashi, S.** (1998). Laminin-dependent integrin clustering with tyrosine-phosphorylated molecules in a Drosophila neuronal cell line. *Neurosci Lett* **244**, 149-52.
- Tarone, G., Hirsch, E., Brancaccio, M., De Acetis, M., Barberis, L., Balzac, F., Retta, S. F., Botta, C., Altruda, F., Silengo, L. et al.** (2000). Integrin function and regulation in development. *Int J Dev Biol* **44**, 725-31.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G., Dodd, J. and Jessell, T. M.** (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* **336**, 775-8.

- The, I., Bellaiche, Y. and Perrimon, N.** (1999). Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell* **4**, 633-9.
- Thomas, J. B., Crews, S. T. and Goodman, C. S.** (1988). Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the Drosophila nervous system. *Cell* **52**, 133-141.
- Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V. et al.** (1999). The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in Drosophila. *Nature* **400**, 276-80.
- Umemiya, T., Takeichi, M. and Nose, A.** (1997). M-spondin, a novel ECM protein highly homologous to vertebrate F-spondin, is localized at the muscle attachment sites in the Drosophila embryo. *Dev Biol* **186**, 165-76.
- Vargesson, N., Luria, V., Messina, I., Erskine, L. and Laufer, E.** (2001). Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. *Mech Dev* **106**, 175-80.
- Wang, K. H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C. S., Henzel, W. and Tessier-Lavigne, M.** (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* **96**, 771-84.
- Winberg, M. L., Mitchell, K. J. and Goodman, C. S.** (1998a). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* **93**, 581-91.
- Winberg, M. L., Noordermeer, J. N., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Spriggs, M. K., Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1998b). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **95**, 903-16.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. *Cell* **82**, 67-76.
- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y. and Rao, Y.** (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* **400**, 331-6.
- Yarnitzky, T. and Volk, T.** (1995). Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the Drosophila embryo. *Dev Biol* **169**, 609-18.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A. and Dearolf, C. R.** (1997). viking: identification and characterization of a second type IV collagen in Drosophila. *Gene* **198**, 17-25.
- Yeo, S. Y., Little, M. H., Yamada, T., Miyashita, T., Halloran, M. C., Kuwada, J. Y., Huh, T. L. and Okamoto, H.** (2001). Overexpression of a slit homologue impairs convergent extension of the mesoderm and causes cyclopia in embryonic zebrafish. *Dev Biol* **230**, 1-17.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M. and Thomas, J. B.** (2003). Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. *Nature* **422**, 583-8.
- Yu, H. H., Araj, H. H., Ralls, S. A. and Kolodkin, A. L.** (1998). The transmembrane Semaphorin Sema I is required in Drosophila for embryonic motor and CNS axon guidance. *Neuron* **20**, 207-20.

- Yu, T. W. and Bargmann, C. I.** (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1169-76.
- Yu, T. W., Hao, J. C., Lim, W., Tessier-Lavigne, M. and Bargmann, C. I.** (2002). Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function. *Nat Neurosci* **5**, 1147-54.
- Yuan, W., Zhou, L., Chen, J. H., Wu, J. Y., Rao, Y. and Ornitz, D. M.** (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* **212**, 290-306.
- Zallen, J. A., Yi, B. A. and Bargmann, C. I.** (1998a). The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* **92**, 217-27.
- Zallen, J. A., Yi, B. A. and Bargmann, C. I.** (1998b). The conserved immunoglobulin superfamily member SAX 3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* **92**, 217-27.
- Zerial, M. and McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17.
- Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J. Y. and Rao, Y.** (1999). Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* **23**, 473-85.

## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
aCC	<i>anterior corner cell</i>
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
bHLH	basic Helix loop Helix (DNA Bindungsmotif)
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
EtOH	Ethanol
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
GMR	Glass Mutimer Reporter
GS	<i>Goat-Serum</i> (Ziegenserum)
h	Stunde(n)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglycan
kb	kilo Basen
kD	kilo Dalton
MAb	<i>Monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MetOH	Methanol
MNB	<i>median neuroblast</i>
MP1	<i>midline precursor 1</i>
MP1	<i>midline precursor 2</i>
MWP	Multiwellplatte

NBT	Nitro-blautetrazolium-Chlorid
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PAb	<i>Polyclonal antibody</i> (polyklonaler Antikörper)
PBS	Phosphatpuffer zur pH-Wert Pufferung um pH7
PBT	PBS mit 0,1% Triton X100 versetzt
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
ü. N.	über Nacht
VUM	<i>ventral unpaired median</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Verwendete Oligonukleotide:

### ECM RNAi-Konstrukte

LanA Ex 12 <i>Xba</i> up	GGATTGCAACCGAATCCTCTAGAGTATC
LanA Ex 12 <i>Xba</i> for	CCACGTCTAGAGTCTTGCGCCAATGGTT
Dally Ex 10 <i>Xba</i> up	CTGATCTAGAGCTAACAGATTTATA
Dally Ex 10 <i>Xba</i> for	CACTCTAGACACAATGCTCTTTAGTA
Cg25C Ex 7 <i>Xba</i> up	GCTCTAGAGACGCCAGCAGGACCAG
Cg25C Ex 7 <i>Xba</i> for	CGGTCTAGATGGACCTCCTGGTTTG
Mys Ex 4 <i>Xba</i> up	CGGCTCTAGAAGCGTCCCTGATCGT
Mys Ex 4 <i>Xba</i> for	GCGTCTAGACACAGACGATCCACAT
If Ex 9 <i>Xba</i> for	GTTCTAGACTTCGGAGAGTGCCTCG
If Ex 9 <i>Xba</i> up	GATCTAGACCACTCCACGACCCTCG

### NETA-TM

upper Cps1	TCTTGGACGGACCGGATGTTGAACTA
lower Cps1	GGCTTCGGTCCGCTTTCCACAG

### NETA-TM-TAG

PCR Myc 8 rev	AGCTGGAGCTCGATCGCGGTGG
PCR Myc 8 fow	CATGATGCGATCGACGCGGAA
pKK31 HindIII up	CTGCAAGCTTCCATCCTGCTACTCCTGCGC
pKK31 HindIII low	TCCGAAGCTTAGGCGGCCGCTCTAGAACT
seq. MYC	CTACACACAGGATGTGGTATTG
seq. MYC rev	TTGATCTTGGGTGCGGACTC
FLAG Oligo	CGATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATCGGGG
FLAG Oligo rev	CGCCCCGATCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCAT
seq. FLAG	CATGATCCGTGGAATCTTGCTC
seq. FLAG rev	ACGATCCGCACGTGGAAC

### Sequenzierungsprimer für *netrinA*

NetA Seq. 1	CATGATCCGTGGAATCTTGC
NetA Seq. 2	GTTCTTTAGCTCCCAGTGCC
NetA Seq. 2 rev	GGCACTGGGAGCTAAAGAAC
NetA Seq. 3	GCTGCAAGCCATTCCACTTC



NetA Seq. 4	CAGTCTCAGTACTATCGCAC
NetA Seq. 5	GATCGTAATCGAATGGAAGG
NetA Seq. 5 rev	CCTTCCATTCGATTACGATC

### **SLIT-Myc-TM**

Xho lower CD2	CTGAGGCTCGAGTTGAGTGTCACT
Bgl II upper CD2	ACCTGAGATCTCCGTTTAAG
BamH1 lower SLIT	TCTTGGTGGATCCGCACTTG
Xho upper SLIT	ACTGTCGCTCGAGGCAGCCG

### **Sequenzierungsprimer**

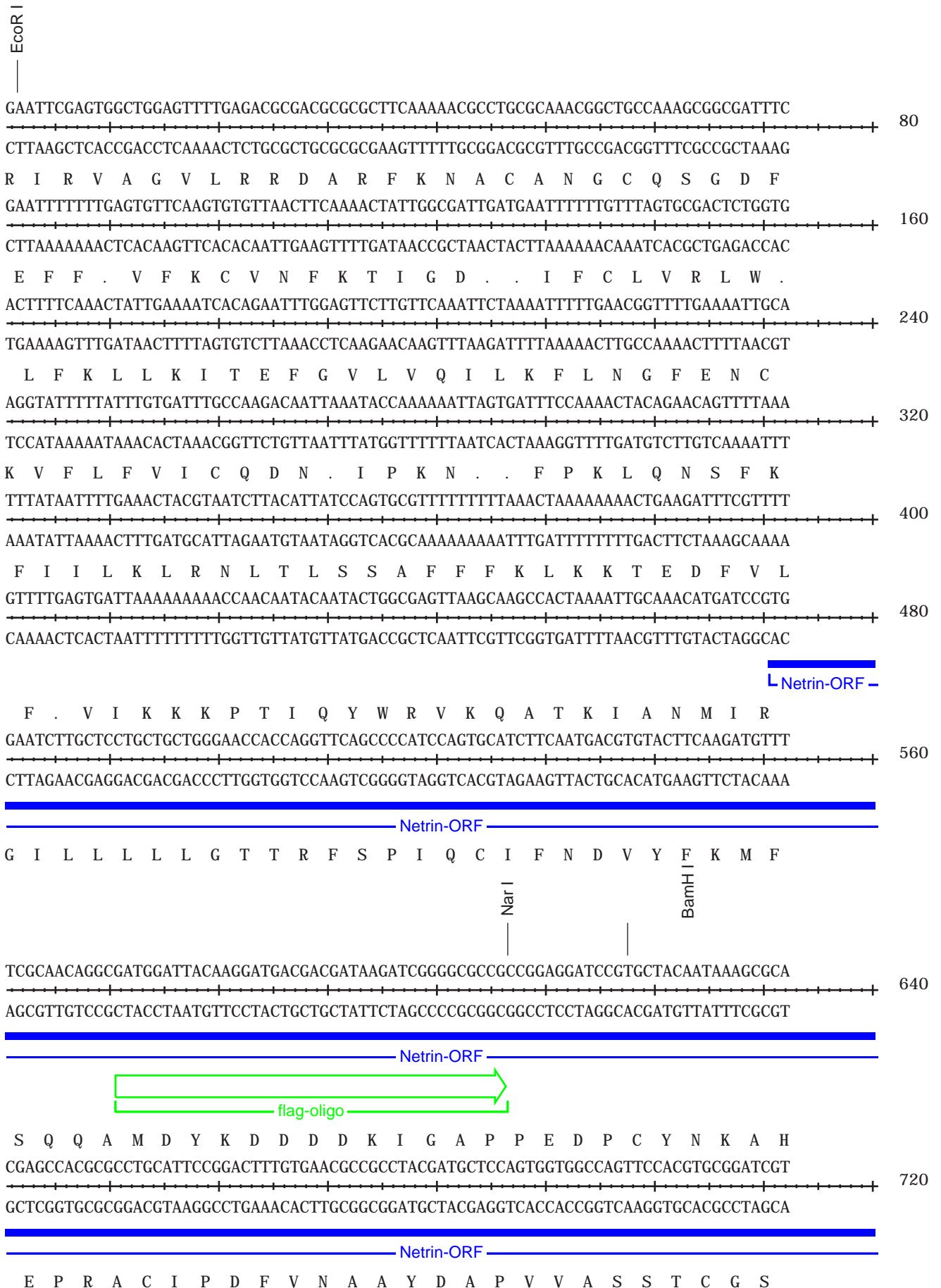
pUAST for	AATTGGGAATTCGTTAACAGATCTGCG
pBS KS	CGAGGTCGACGGTATCG
pBS SK	TCTAGAACTAGGTGGATC

## Liste der verwendeten ECM-Mutationen und EP-Linien

Gene	Genprodukt	Cytologische Position	Allel	Mutation	Phänotyp	EP-Insertion	Mutagen
<b>ECM-Proteine</b>							
<i>laminin A</i>	LAMININ $\alpha$ 3/5	65 A10-11	9-32	amorph	letal	EP(3)-903, 3678 & 664	$\Delta$ 2-3
<i>wing blister</i>	LAMININ $\alpha$ 2	34 F4	9437	-	letal		P-Element
<i>laminin B2</i>	LAMININ $\beta$ 2	67C2				EP(2) 2178	
<i>collagen Typ VI</i>	COLLAGEN IV $\alpha$ 1	25 C5	234	-	-	EP(2) 2553	EMS
	"	"	412	-	-		EMS
	"	"	A109.1F2	-	letal		P-Element
<i>viking</i>	COLLAGEN IV $\alpha$ 2	25 C5	177	-	letal	EP(2) 2181	EMS
	"	"	228	-	letal		EMS
	"	"	K07138	-	letal		P-Element
	"	"	K00236	-	letal		P-Element
<i>m-spondin</i>	SPONDIN	51 C	c26	amorph	lebensfähig		-
<i>tenascin major</i>	TENASCIN	79 E3--4	5309	amorph	letal	EP(3) 3051	P-Element
<i>tiggrin</i>	TIGGRIN	26 D1--2	X	-	letal		$\Delta$ 2-3
<i>syndecan</i>	HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN	57 E1--6	K10215	-	letal	EP(2) 2641, 2218 & 2047	P-Element
<i>perlecan / terribly reduced optic lobes (trol)</i>	HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN	3A 3--4	13	<i>hypomorph</i>	letal	EP(X)-1447 & 1619	Röntgen
<b>ECM-Rezeptoren</b>							
<i>dally</i>	HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN	66 E1--2	6464	hypomorph	semi letal	EP(3)- 634 & 581	P-Element
<i>inflated</i>	INTEGRIN $\alpha$ PS2	15 A1--4	B2	amorph	letal		EMS
<i>multiple edematous wings</i>	INTEGRIN $\alpha$ PS1	11 D7--E4	M6	amorph	letal	EP(X)-1365	P-Element
<i>beta (nu) integrin</i>	INTEGRIN $\beta$	39 A1				EP(X)- 2235	
<i>myospheroid</i>	INTEGRIN $\beta$ PS	7 D5	1	amorph	letal	EP(X)- 439 & 1033	-
<i>scab</i>	INTEGRIN $\alpha$ PS3	51 E10-11	2	-	-	EP(2) 2591	EMS

# NetrinA-TM DNA-Sequenz

In die NetrinA-cDNA wurde eine Transmembrandomäne aus dem CD2-Gen der Ratte eingefügt (an Position 2605 bp - 2961 bp)



NetrinA-TM DNA-Sequenz

BamH I

CGGGTGCAGCGATATTGCGAGTACCAGGATCACGAGCGCTCCTGCCACACCTGCGACATGACGGATCCGTTGCGCAGC  
800  
CCCCACGCGTCTATAACGCTCATGGTCTAGTGCTCGCGAGGACGGTGTGGACGCTGTACTGCCTAGGCAACGCGTCTG

Netrin-ORF

S G A Q R Y C E Y Q D H E R S C H T C D M T D P L R S  
880  
TTTCAGCCCCTCGCTGACCGATTTGAATAACTCGAATAATGTGACCTGCTGGCGCAGTGAGCCGGTGACCGGAAGTGG  
AAAGGTCGGGCGAGCGACTGGCTAAACTTATTGAGCTTATTACACTGGACGACCGCGTCACTCGGCCACTGGCCTTCACC

Netrin-ORF

F P A R S L T D L N N S N N V T C W R S E P V T G S G  
960  
GGACAACGTAACCTTGACCCTCTCGCTGGGAAGAAGTTCGAGCTGACCTATGTGATCCTACAGCTGTGCCCGCATGCTC  
CCTGTTGCATTGGAAGTGGGAGAGCGACCCGTTCTCAAGCTCGACTGGATACACTAGGATGTCGACACGGGCGTACGAG

Netrin-ORF

D N V T L T L S L G K K F E L T Y V I L Q L C P H A  
1040  
CGCGTCCCATTGCGATGGTATCTACAAGAGCACCGATCACGGGCTCAGTTGGCAGCCATTCCAGTCTTTAGCTCCCAG  
GCGCAGGGCTAAGCTACCACTAGATGTTCTCGTGGCTAGTGCCCGAGTCAACCGTCGGTAAGGTCAGAAATCGAGGGTC

Netrin-ORF

P R P D S M V I Y K S T D H G L S W Q P F Q F F S S Q

Pst I

TGCCCGCGCTTTTCGGACGTCCC GCCCAATCCACTGGACGCCACAATGAGCAGGCGCGCTGCAGCGATGTAC  
1120  
ACGGCGGCCAAAAGCTGCAGGGCGGGCGGTTAGGTGACCTGCGGTGTTACTCGTGCTCCGCGGACGTCGCTACAGTG

Netrin-ORF

C R R L F G R P A R Q S T G R H N E H E A R C S D V T  
1200  
CAGGCCACTGGTCTCCAGAATTGCCTTCAGCACACTGGAGGGACGCCATCGTCACGGGATCTGGACTCATCGCCGGTGC  
GTCCGGTGACCAGAGGTCTTAACGGAAGTCGTGTGACCTCCCTGCGGGTAGCAGTGCCTAGACCTGAGTAGCGGCCACG

Netrin-ORF

R P L V S R I A F S T L E G R P S S R D L D S S P V

Pst I

EcoR V

TGCAGGACTGGGTGACGGCCACCGATATCCGGTGGTGTTCATCGCCTTCAACGCCCCGATCCGACGGCCCTGCTCTCA  
1280  
ACGTCCTGACCACTGCCGGTGGCTATAGGCCACCACAAGGTAGCGGAAGTTGCGGGGCTAGGCGTCCGGGACGAGAGT

Netrin-ORF

L Q D W V T A T D I R V V F H R L Q R P D P Q A L L S  
1360  
TTGGAAGCCGGAGGAGCAACGGATTTGGCCAGCGAAAAGTACAGTGTGCCCTGGCCAATGGACCCGCTGGCAATAATAT  
AACCTTCGGCTCCTCGTTGCCTAAACGGTTCGCTTTTCATGTACACGGGGACCGGTTACCTGGGCGACCGTTATTATA

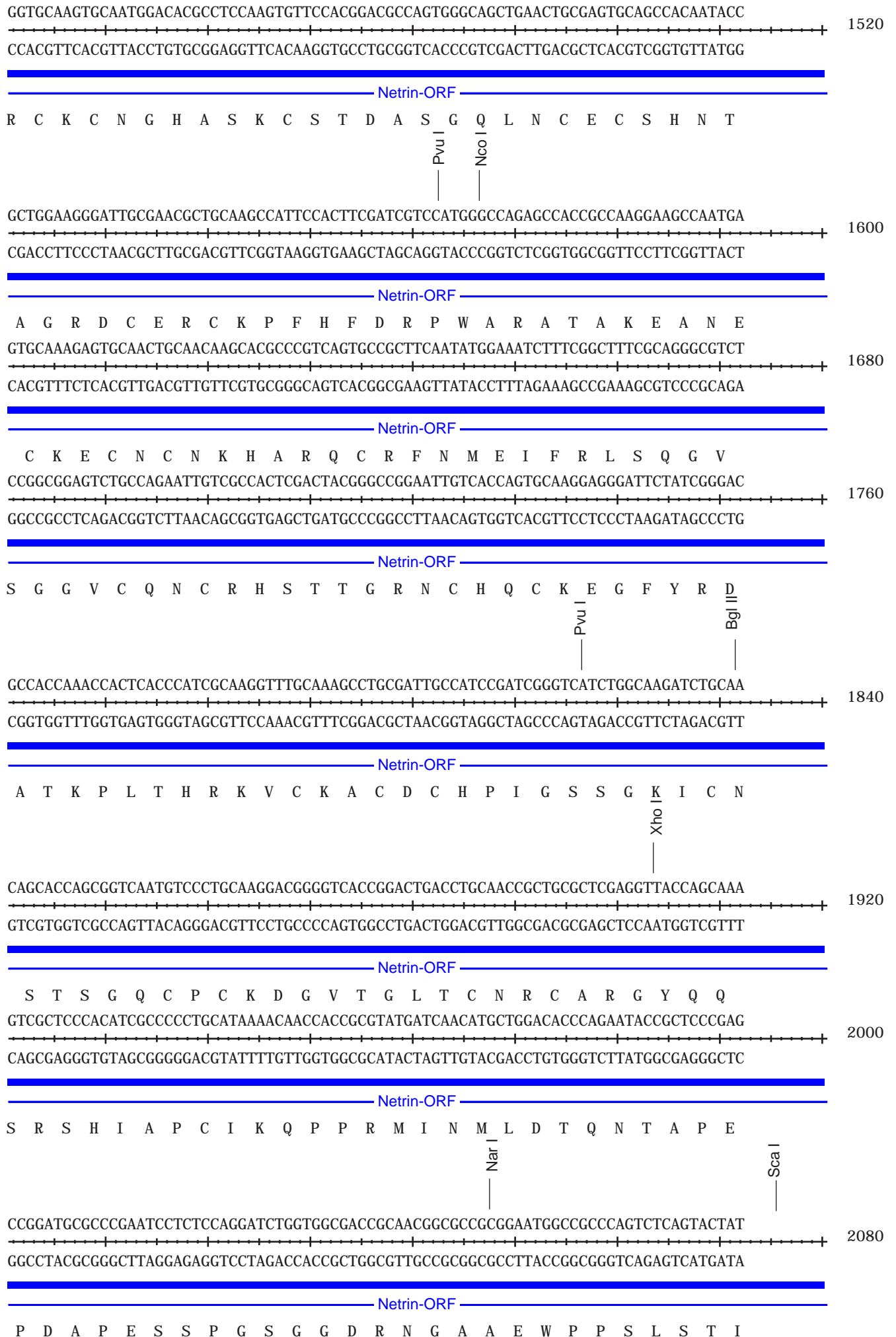
Netrin-ORF

L E A G G A T D L A S G K Y S V P L A N G P A G N N I  
1440  
TGAGGCGAATCTCGGTGGGATGTGGCAACATCCGGCAGTGGATTGCACTATGCCATCTCTGACTTTTCGGTGGGCGGAC  
ACTCCGCTTAGAGCCACCCCTACACCGTTGTAGGCCGTACCTAACGTGATACGGTAGAGACTGAAAAGCCACCCGCTG

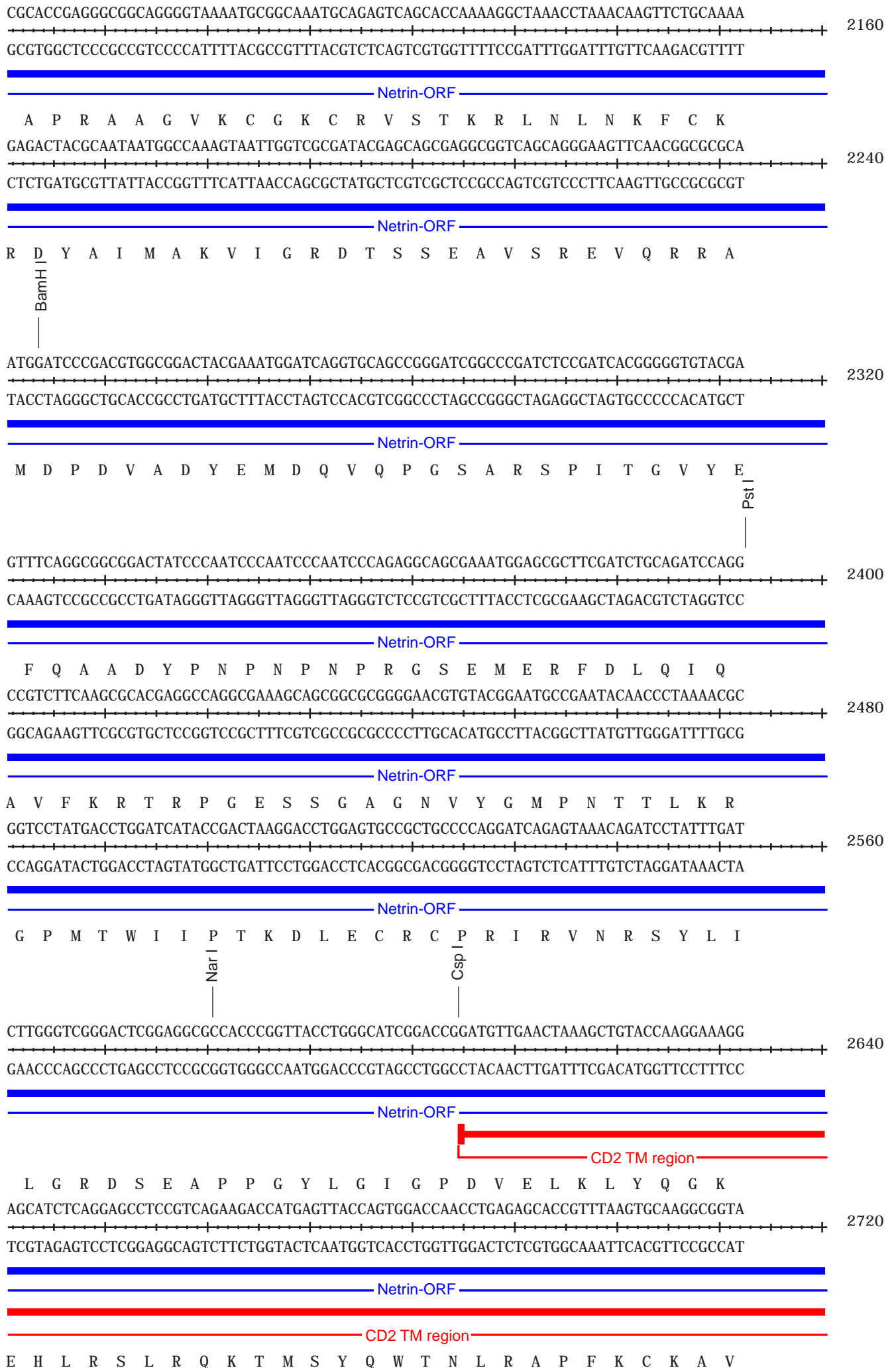
Netrin-ORF

E A N L G G D V A T S G S G L H Y A I S D F S V G G

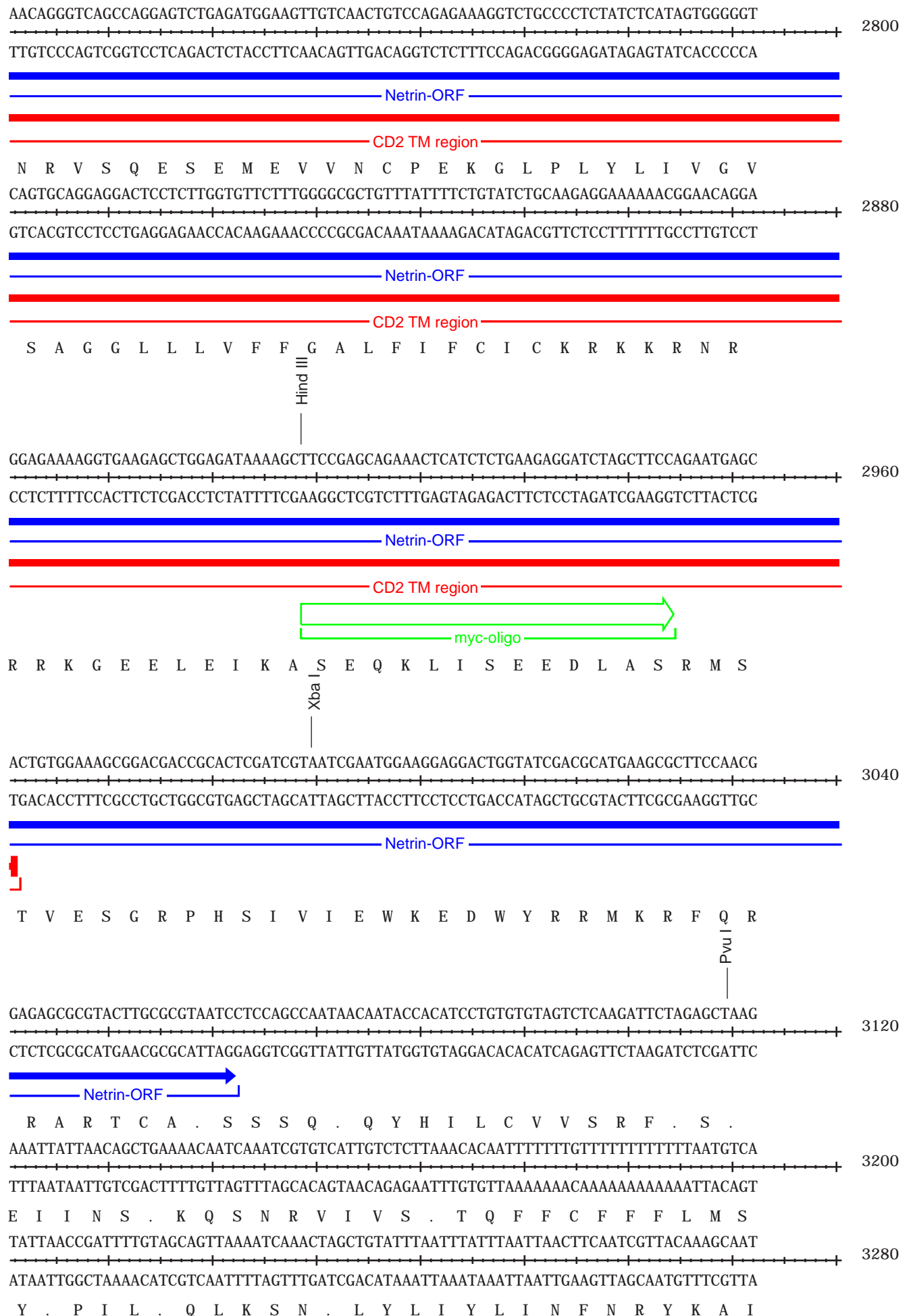
# NetrinA-TM DNA-Sequenz



# NetrinA-TM DNA-Sequenz



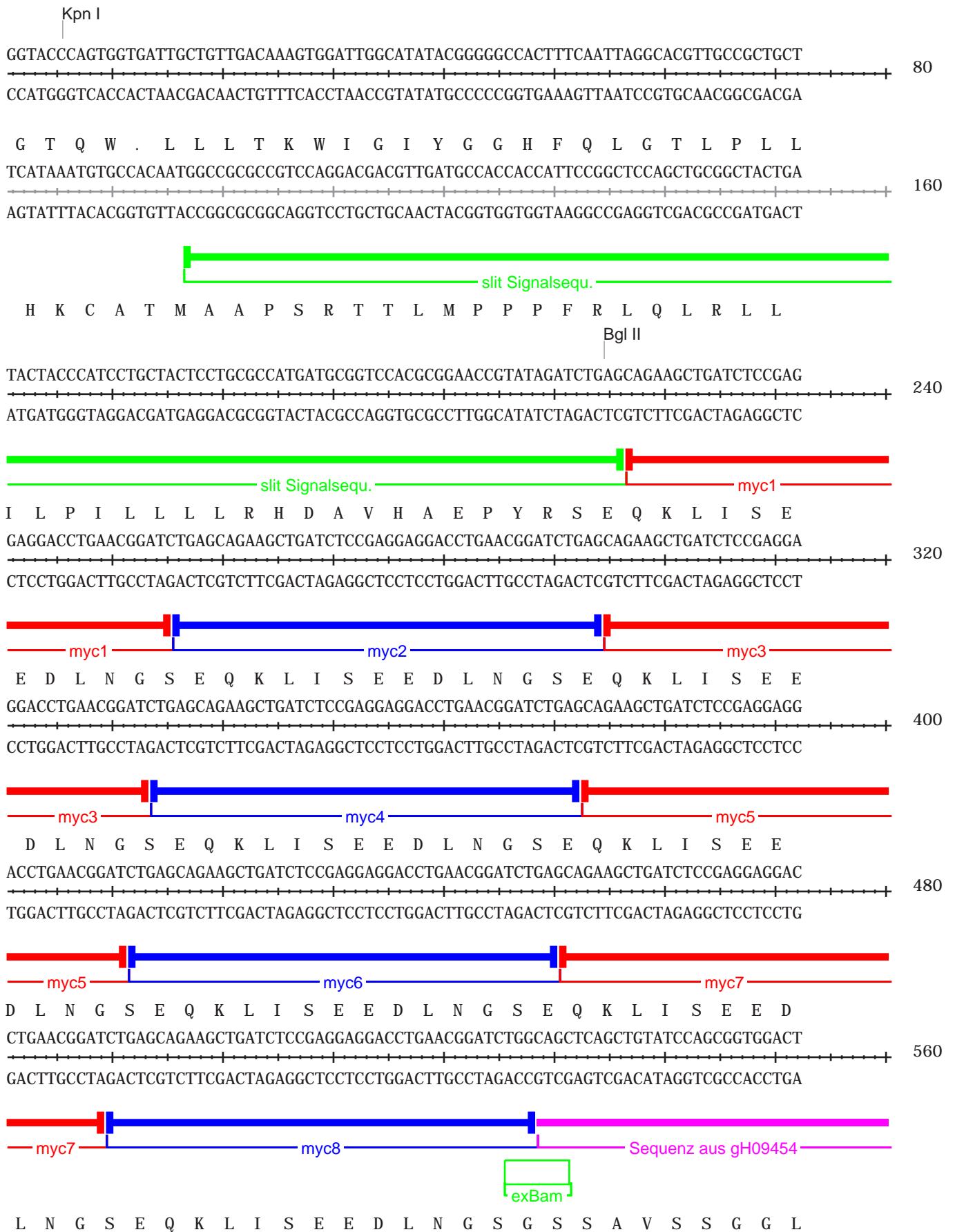
# NetrinA-TM DNA-Sequenz



# Slit-MYC DNA-Sequenz

□

Ein MYC-Epitop markiertes Slit-Protein wurde aus verschiedenen Slit-cDNA-Klonen kloniert. □  
 Dabei wurden die cDNA-Klone gH09454 und pcDNA3-slit sowie ein 8-fach MYC-Konstrukt □  
 (pKK31) verwendet.





# Slit-MYC DNA-Sequenz

GGGGTCAGTGGGCATTACATAACCCGGCGGCGGAGTGGGCGTCATCACGGAGGCCCGCTGCCCGAGGGTCTGCTCCTGCA 640  
CCCCAGTCACCCGTAAGTGTATGGGCCGCCGCTCACCCGAGTAGTGCTCCGGGCGACGGGCTCCCAGACGAGGACGT

Sequenz aus gH09454

G S V G I H I P G G G V G V I T E A R C P R V C S C

Xho I

CCGGATTAATGTGGATTGCTCGCATCGAGGACTCACCTCCGTTCCCAGGAAAATCTCAGCGGACGTGGAGCGACTCGAG 720  
GGCCTAATTTACACCTAACGAGCGTAGCTCCTGAGTGGAGGCAAGGGTCCTTTTAGAGTCGCTGCACCTCGCTGAGCTC

Sequenz aus gH09454

T G L N V D C S H R G L T S V P R K I S A D V E R L E

Pst I

CTGCAGGAAACAATTTGACCGTGATATACGAGACGGATTTCCAGCGGCTGACCAAGCTGCGAATGCTCCAATAACTGA 800  
GACGTCCCTTTGTAAACTGGCACTATATGCTCTGCCTAAAGGTCGCCGACTGGTTCGACGCTTACGAGGTTGATTGACT

Sequenz aus gH09454

L Q G N N L T V I Y E T D F Q R L T K L R M L Q L T D

Pvu I

Xho I

CAATCAGATCCACACGATCGAGAGGAACTCCTTCCAAGATTTGGTCTCACTCGAGCGACTACGCCTAAACAACAATCGAC 880  
GTTAGTCTAGGTGTGCTAGCTCTCCTTGAGGAAGGTTCTAAACCAGAGTGAGCTCGCTGATGCGGATTTGTTGTTAGCTG

Sequenz aus gH09454

N Q I H T I E R N S F Q D L V S L E R L R L N N N R 960  
TAAAGCAATTCCTGAAAACCTTGTGACAAGTTCAGCGAGTCTTTTGGCATTGGACATCTCCAACAATGTCATCAGACC  
ATTTCCGTTAAGGACTTTTGAAACACTGTTCAAGTCGCTCAGAAAACGCTAACCTGTAGAGGTTGTTACAGTAGTGCTGG

Sequenz aus gH09454

L K A I P E N F V T S S A S L L R L D I S N N V I T T 1040  
GTGGGTAGACCGCTCTCAAGGGAGCCAATCGTTGCGGAGTCTTCAGCTGGACAATAACCAAATCACCTGCCTGGATGA  
CACCCATCTGCGCAGAAGTTCCCTCGGGTTAGCAACGCCCTCAGAAGTCGACCTGTTATTGGTTTAGTGGACGGACCTACT

Sequenz aus gH09454

V G R R V F K G A Q S L R S L Q L D N N Q I T C L D E 1120  
GCACGCCTTTAAGGATTGGTGGAGCTGGAGATACTACGCTGAACAACAACCTGACTTCCCTGCCGACAACATCT  
CGTGCGGAAATTCCTAACACCTCGACCTCTATGAGTGCGACTTGTGTTGTTGGACTGAAGGGACGGCGTGTGTAGA

Sequenz aus gH09454

H A F K G L V E L E I L T L N N N N L T S L P H N I 1200  
TCGGCGGACTGGGACGTTTGGCGGCACTCCGGCTGTCGACAATCCGTTGCTGCGACTGCCATCTGCTCTGGCTGTCC  
AGCCGCTGACCCTGCAAACGCCCGTGAGGCCGACAGCCTGTTAGGCAAGCGGACGCTGACGGTAGACAGGACCGACAGC

Sequenz aus gH09454

F G G L G R L R A L R L S D N P F A C D C H L S W L S

# Slit-MYC DNA-Sequenz

CGATTCCCTTCGCAGTGCCACCCGCCTGGCGCCCTACACCCGCTGCCAGTCGCCATCGCAGCTGAAGGGCCAAAACGTGGC 1280  
GCTAAGGAAGCGTCACGGTGGGCGGACCGCGGGATGTGGGCGACGGTCAGCGGTAGCGTTCGACTTCCCGGTTTTGCACCG

Sequenz aus gH09454

R F L R S A T R L A P Y T R C Q S P S Q L K G Q N V A  
GGACCTGCACGACCAGGAGTTCAAATGCTCGGGTCTGACGGAGCACGCACCGATGGAATGCGGGGCGGAGAACAGCTGTC 1360  
CCTGGACGTGCTGGTCTCAAGTTTACGAGCCCAGACTGCCTCGTGCCTGGCTACCTTACGCCCCGCCTTGTGTCGACAG

Sequenz aus gH09454

D L H D Q E F K C S G L T E H A P M E C G A E N S C  
CGCACCCATGTGCTGTGCGGACGGGATCGTTCGATTGCCGTGAGAAGAGTCTGACCAGCGTGCCCGTCACTTTGCCCGAC 1440  
GCGTGGGTACAGCGACAGCCTGCCCTAGCAGCTAACGGCACTTCTCAGACTGGTTCGCACGGGCAGTGAAACGGGCTG

Sequenz aus gH09454

P H P C R C A D G I V D C R E K S L T S V P V T L P D  
Sac I Xho I  
GACACCACCGAGCTCCGCCTCGAGCAGAATTTTCATTACGGAAGTCCCGCGAAATCGTTCTCCAGCTTTCGACGACTGCG 1520  
CTGTGGTGGCTCGAGGCGGAGCTCGTCTTAAAGTAATGCCTTGACGGCGGCTTTAGCAAGAGGTCGAAAGCTGCTGACGC

Sequenz aus gH09454

D T T E L R L E Q N F I T E L P P K S F S S F R R L R  
ACGCATCGACCTGTCCAACAACAACATATCCCGGATTGCCACGATGACTAAGCGGCCTAAAGCAGTTAACCACTCTCG 1600  
TGCGTAGCTGGACAGGTTGTTGTTGTATAGGGCCTAACGGGTGCTACGTGATTGCGCGGATTTTCGTC AATTGGTGAGAGC

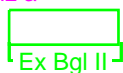
Sequenz aus gH09454

R I D L S N N N I S R I A H D A L S G L K Q L T T L  
Pst I  
TGCTGTACGGCAATAAAATAAAGGATTTACCCTCGGGCGTGTTCAAAGGACTCGGCTCGCTGCAGCTGCTGCTGCTGAAC 1680  
ACGACATGCCGTTATTTTATTTCTAAATGGGAGCCCGACAAGTTTCTGAGCCGAGCGACGTCGACGACGACGACTTG

Sequenz aus gH09454

V L Y G N K I K D L P S G V F K G L G S L Q L L L L N  
GCCAACGGGATCTCGTGACATACGCAAGGATGCCTTTTCGCGACCTGCACAGTTTGAGCCTGCTCTCCCTGTACGACAACAA 1760  
CGGTTGCCCTAGAGCAGTATGCGTTCCTACGAAAGCGCTGGACGTGTCAAACCTCGGACGAGAGGGACATGCTGTTGTT

Sequenz a Sequenz aus pcDNA3



A N G I S C I R K D A F R D L H S L S L L S L Y D N N  
CATCCAGTCGCTGGTAATGGCACATTCGACGCCATGAAGAGCATCAAAACGGTACATCTGGCCAAGAATCCTTTTCATCT 1840  
GTAGGTCAGCGACCGATTACCGTGAAGCTGCGGTACTTCTCGTAGTTTTGCCATGTAGACCGGTTCTTAGGAAAGTAGA

Sequenz aus pcDNA3

I Q S L A N G T F D A M K S I K T V H L A K N P F I

CGGACTGCAATCTGCGCTGGCTGGCCGACTATTTGCACAAAAATCCCATAGAGACGAGTGGAGCCCGCTGCGAGTCACCG  
CGCTGACGTTAGACGCGACCGACCGGCTGATAAACGTGTTTTTAGGGTATCTCTGCTCACCTCGGGCGACGCTCAGTGGC

1920

Sequenz aus pcDNA3

C D C N L R W L A D Y L H K N P I E T S G A R C E S P  
AAGCGGATGCATCGTCTCGGATTGAATCGCTGCGCGAGGAGAAATTCAAATGCTCTGGGATGAATTGCGGATGAAGCT  
TTCGCCTACGTAGCAGCAGCCTAACTTAGCGACGCGCTCCTCTTAAAGTTTACGAGGACCCTACTTAACGCCTACTTCGA

2000

Sequenz aus pcDNA3

K R M H R R R I E S L R E E K F K C S W D E L R M K L  
GTCCGGCGAGTGCCGCATGGACTCCGACTGTCCGGCCATGTGCCACTGCGAGGGCACCACCGTGGATTGCACGGGCGGG  
CAGGCCGCTACGGCGTACCTGAGGCTGACAGGCCGTACACGGTGACGCTCCCGTGGTGGCACCTAACGTGCCGGGCC

2080

Sequenz aus pcDNA3

S G E C R M D S D C P A M C H C E G T T V D C T G R  
GCCTGAAGGAGATTCCGCGGACATTCCCTGCACACAACCTGAGCTTTTGCTCAACGACAACGAACTGGGACGCATCAGT  
CGGACTTCTCTAAGGCGCGCTGTAAGGGGACGTGTGTTGACTCGAAAACGAGTTGCTGTTGCTTGACCCTGCGTAGTCA

2160

Sequenz aus pcDNA3

G L K E I P R D I P L H T T E L L L N D N E L G R I S  
TCCGATGGCTCTTTGGTGCCTGCCGACTTGGTGAAGCTGGAATGAAGCGCAACCAGCTGACCGGCATCGAGCCAA  
AGGCTACCGGAGAAACCAGCGGACGGCGTGAACCACTTCGACCTTAACTTCGCGTTGGTTCGACTGGCCGTAGCTCGGGTT

2240

Sequenz aus pcDNA3

S D G L F G R L P H L V K L E L K R N Q L T G I E P N  
CGCCTTCGAGGGAGCATCCCACATCCAGGAGTTGCAGCTGGGCGAGAACAAGATCAAGGAGATATCGAACAAGATGTTCC  
GCGGAAGCTCCCTCGTAGGGTGTAGGTCCTCAACGTCGACCCGCTCTTGTTCTAGTTCCTCTATAGCTTGTCTACAAGG  
EcoR V

2320

Sequenz aus pcDNA3

A F E G A S H I Q E L Q L G E N K I K E I S N K M F  
TGGGACTGCACCAACTAAAAACGCTCAATCTGTACGACAATCAAATCTCATGCGTTATGCCCGTTCTTTGAGCATCTC  
ACCCTGACGTGGTTGATTTTTGCGAGTTAGACATGCTGTTAGTTTAGAGTACGCAATACGGGCAAGGAACTCGTAGAG

2400

Sequenz aus pcDNA3

L G L H Q L K T L N L Y D N Q I S C V M P G S F E H L  
AACTCTGACGTCGCTGAACCTCGCATCGAATCCATTCAATTGCAATTGTCATTTGGCCTGGTTGCGGAATGGCTGCG  
TTGAGAGACTGCAGCGACTTGAGCGTAGCTTAGGTAAGTTAACGTTAACAGTAAACCGGACCAAGCGCCTTACCGACGC

2480

Sequenz aus pcDNA3

N S L T S L N L A S N P F N C N C H L A W F A E W L R  
CAAAAACTACTGAACGGCGGAGCGGCAGTGTGGAGCCCGTCAAGGTACGTGACGTGCAGATCAAGGACTTGCCCC  
GTTTTTATGACTTGCCGCTCGCCGTGCAACACCTCGGGCAGCTTCCATGCACTGCACGCTAGTTCTGAAACGGGG

2560

Sequenz aus pcDNA3

K K S L N G G A A R C G A P S K V R D V Q I K D L P

# Slit-MYC DNA-Sequenz

EcoR I

ACTCGGAATTCAAGTGTAGCAGCGAGAACAGCGAGGGCTGCCTGGGCGATGGCTACTGTCCGCCATCCTGCACCTGCACC 2640  
TGAGCCTTAAGTTCACATCGTCGCTCTTGTGCGTCCCGACGGACCCGCTACCGATGACAGGCGGTAGGACGTGGACGTGG

Sequenz aus pcDNA3

H S E F K C S S E N S E G C L G D G Y C P P S C T C T 2720  
GGCACCGTGGTCCGCTGTTTCGCGTAACCAGCTGAAGGAGATACCGCGCGGCATTCCCGCCGAGACATCGGAGCTGTATCT  
CCGTGGCACCAGGCGACAAGCGCATTGGTTCGACTTCTCTATGGCGCGCCGTAAGGGCGGCTCTGTAGCCTCGACATAGA

Sequenz aus pcDNA3

G T V V R C S R N Q L K E I P R G I P A E T S E L Y L 2800  
GGAGTCCAATGAGATCGAGCAGATTCACTACGAACGCATACGCCATTTGCGCTCCCTTACCCGACTCGATCTCAGCAACA  
CCTCAGTTACTCTAGCTCGTCTAAGTGATGCTTGCATGCGGTAACGCGAGGAATGGGCTGAGCTAGAGTCGTTGT

Sequenz aus pcDNA3

E S N E I E Q I H Y E R I R H L R S L T R L D L S N 2880  
ACCAGATCACCATTCTCTCCAACCTACACCTTGGCAATCTGACCAAGCTGTCCACGCTCATCATCTCATACAACAAGCTG  
TGGTCTAGTGGTAAGAGAGGTTGATGTGAAACGGTTAGACTGGTTCGACAGGTGCGAGTAGTAGATATGTTGTTTCGAC

Sequenz aus pcDNA3

N Q I T I L S N Y T F A N L T K L S T L I I S Y N K L 2960  
Pst I Pst I Sph I  
CAGTGTCTGCAGCGGCATGCGTTGTCTGGCCTGAATAACCTGCGCGTGCTTTCGCTGCACGGTAACCGCATCTCGATGCT  
GTCACAGACGTGCCGTACGCAACAGACCGGACTTATTGGACGCGCACGAAAGCGACGTGCCATTGGCGTAGAGCTACGA

Sequenz aus pcDNA3

Q C L Q R H A L S G L N N L R V L S L H G N R I S M L 3040  
GCCGGAAGGCTCCTTCGAGGACCTCAAGTCGTTGACCCACATCGCACTAGGCAGCAATCCCTTGACTGCGATTGCGGTC  
CGGCCTTCGAGGAAGCTCCTGGAGTTCAGCAACTGGGTGTAGCGTGATCCGTCGTTAGGGAACATGACGCTAACGCCAG

Sequenz aus pcDNA3

P E G S F E D L K S L T H I A L G S N P L Y C D C G 3120  
TGAAGTGGTTCTCCGATTGGATAAAGCTGGACTACGTGGAACCGGAATTGCACGTTGCGCCGAACCGGAACAGATGAAG  
ACTTCACCAAGAGGCTAACCTATTTGACCTGATGCACCTTGGCCCTTAACGTGCAACGCGGCTTGGCCTTGTCTACTTC

Sequenz aus pcDNA3

L K W F S D W I K L D Y V E P G I A R C A E P E Q M K 3200  
Not I  
GATAAGCTGATCCTGTCCACACCCCTCGTCGAGCTTCGTTTGGCCGCGCCGCGTGCACCAATGATATTCTGGCCAAGTGCAA  
CTATTGACTAGGACAGGTGTGGGAGCAGCTCGAAGCAAACGGCGCCGCGCACGCGTTACTATAAGACCGGTTTCACGTT

Sequenz aus pcDNA3

D K L I L S T P S S S F V C R G R V R N D I L A K C N

# Slit-MYC DNA-Sequenz

CGCCTGTTTTGAGCAGCCGTGCCAGAATCAAGCGCAGTGCCTGGCCCTTCCGCAGCGAGAGTACCAGTGCCTCTGCCAGC 3280  
GCGGACAAAACCTCGTCGGCAGGTCTTAGTTCGCGTCACGCACCGGGAAGGCGTGCCTCTCATGGTCACGGAGACGGTGC

Sequenz aus pcDNA3

A C F E Q P C Q N Q A Q C V A L P Q R E Y Q C L C Q

Cla I

CGGGCTATCATGGCAAACACTGTGAGTTTATGATCGATGCTTGCTACGAAATCCGTGCCGCAACAATGCCACTTGCACG 3360  
GCCCGATAGTACCGTTTGTGACACTCAAATACTAGCTACGAACGATGCCTTTAGGCACGGCGTTGTTACGGTGAACGTGC

Sequenz aus pcDNA3

P G Y H G K H C E F M I D A C Y G N P C R N N A T C T 3440  
GTGCTGGAGGAGGGTCGTTTCAGCTGTCAGTGCCTCCGGGATACACAGGTGCCCGCTGCGAGACGAATATCGACGATTG  
CAGGACCTCCTCCAGCAAAGTCGACAGTCACGCGAGGCCCTATGTGTCCACGGGCGACGCTCTGCTTATAGCTGCTAAC

Sequenz aus pcDNA3

V L E E G R F S C Q C A P G Y T G A R C E T N I D D C 3520  
CCTGGGCGAGATCAAGTGCCAGAAACATGCCACCTGCATCGACGGAGTGGAGTTCGTACAAATGTGAGTGCCAGCCGGGAT  
GGACCCGCTCTAGTTCACGGTCTTGTACGGTGGACGTAGCTGCCTCACCTCAGCATGTTTACACTCAGGTTCGGCCCTA

Sequenz aus pcDNA3

L G E I K C Q N N A T C I D G V E S Y K C E C Q P G

Pst I

TCAGTGGCGAGTTCTGCGACACAAAATCCAGTTCTGCGAGTCCGGAGTTCAATCCCTGCGCGAATGGAGCCAAGTGCATG 3600  
AGTCACCGCTCAAGACGCTGTGGTTTTAGGTCAAGACGTACGGCCTCAAGTTAGGGACGCGCTTACCTCGGTTACGTAC

Sequenz aus pcDNA3

F S G E F C D T K I Q F C S P E F N P C A N G A K C M 3680  
GACCACTTTACCACTACAGCTGCGATTGTCAGGCAGGTTTCCATGGCACCAACTGCACGGACAATATTGACGACTGCCA  
CTGGTGAAATGGGTGATGTCGACGCTAACAGTCCGTCCAAAGGTACCGTGGTTGACGTGCCTGTTATAACTGCTGACGGT

Sequenz aus pcDNA3

D H F T H Y S C D C Q A G F H G T N C T D N I D D C Q 3760  
GAACCACATGTGCCAGAACGGTGAACGTGCGTGGACGGCATCAACGACTACCAATGCCGCTGTCCAGACGACTATACGG  
CTTGGTGTACACGGTCTTGCCACCTTGCACGCACCTGCCGTAGTTGCTGATGGTTACGGCGACAGGTCTGCTGATATGCC

Sequenz aus pcDNA3

N H M C Q N G G T C V D G I N D Y Q C R C P D D Y T 3840  
GCAAGTACTGTGAAGGCCACAACATGATCTCGATGATGTATCCACAGACGTGCCTTGTCAAACCACGAGTGCAAGCAC  
CGTTCATGACACTTCCGGTGTGTACTAGAGCTACTACATAGGTGTCTGCAGCGGAACAGTTTTGGTGCTCACGTTCCGTG

Sequenz aus pcDNA3

G K Y C E G H N M I S M M Y P Q T S P C Q N H E C K H

# Slit-MYC DNA-Sequenz

GGTGTCTGCTTCCAACCGAACGCTCAGGGCAGCGACTACCTATGCAGGTGTCATCCGGGTTACACTGGAAAGTGGTGCGA  
----- 3920  
CCACAGACGAAGGTTGGCTTGGCAGTCCCGTCGCTGATGGATACGTCCACAGTAGGCCCAATGTGACCTTTCACCACGCT

Sequenz aus pcDNA3

G V C F Q P N A Q G S D Y L C R C H P G Y T G K W C E

Hind III

GTACCTCACCAGCATAAGCTTTGTCCACAACAACTCGTTTGTAGAACTGGAGCCACTGCGAACACGTCCGGAGGCGAACG  
----- 4000  
CATGGAGTGGTCGTATTTCGAAACAGGTGTTGTTGAGCAAACATCTTGACCTCGGTGACGCTTGTGCAGGCCTCCGCTTGC

Sequenz aus pcDNA3

Y L T S I S F V H N N S F V E L E P L R T R P E A N

EcoR I

TGACGATAGTCTTCAGTAGCGCGGAGCAGAATGGAATTCTCATGTACGACGGCCAGGATGCTCATCTTGCAGTGGAAGT  
----- 4080  
ACTGCTATCAGAAGTCATCGCGCTCGTCTTACCTTAAGAGTACATGCTGCCGGTCTACGAGTAGAACGTCACCTTGAC

Sequenz aus pcDNA3

V T I V F S S A E Q N G I L M Y D G Q D A H L A V E L

TTTAATGGGCGTATTTCGGGTTAGCTACGATGTGGGTAATCACCTGTGTCCACGATGTACAGCTTTGAGATGGTGCCGA  
----- 4160  
AAATTACCCGCATAAGCCCAATCGATGCTACACCCATTAGTGGGACACAGGTGCTACATGTCGAAACTCTACCACCGCT

Sequenz aus pcDNA3

F N G R I R V S Y D V G N H P V S T M Y S F E M V A D

TGGAAAGTACCATGCCGTGGAGCTTCTGGCCATCAAGAAGAAATTCACGCTGCCGCTGGATCGCGGATTGGCCCGTCCA  
----- 4240  
ACCTTTCATGGTACGGCACCTCGAAGACCGGTAGTTCTTCTTAAAGTGCAGCGCACCTAGCGCTAACCAGGCAAGGT

Sequenz aus pcDNA3

G K Y H A V E L L A I K K N F T L R V D R G L A R S

BamH I

TCATCAACGAGGGCTCCAACGACTACCTGAAACTCACGACGCCATGTTCCGGGCGGCTACCCGTGGATCCTGCACAG  
----- 4320  
AGTAGTTGCTCCCGAGGTTGCTGATGGACTTTGAGTGCTGCGGTTACAAGACCCGCCGATGGGCACCTAGGACGTGTC

Sequenz aus pcDNA3

I I N E G S N D Y L K L T T P M F L G G L P V D P A Q

CAGGCGTACAAGAAGTGGCAAATACGCAACCTTACCAGCTTTAAGGGCTGCATGAAGGAGGTGTGGATCAATCATAAGCT  
----- 4400  
GTCCGCATGTTCTTGACCGTTTATGCGTTGGAATGGTCGAAATTCCTGACGTAATCCTCCACACCTAGTTAGTATTGCA

Sequenz aus pcDNA3

Q A Y K N W Q I R N L T S F K G C M K E V W I N H K L

GGTGCAGCTTTGGCAATGCCAGCGCCAGCAAAAGATCACACCAGGATGTGCCCTGCTCGAAGGAGAGCAGCAAGAGGAGG  
----- 4480  
CCAGCTGAAACCGTTACGGGTGCGGTCGTTTCTAGTGTGGTCTACACGGGACGAGCTTCTCTCGTCTCTCTCTCC

Sequenz aus pcDNA3

V D F G N A Q R Q Q K I T P G C A L L E G E Q Q E E

# Slit-MYC DNA-Sequenz

BamH I

AAGACGACGAGCAGGATTTTCATGGACGAGACACCGCACATCAAAGAGGAGCCGGTGGATCCTTGCCTGGAGAACAAATGC 4560  
TTCTGCTGCTCGTCTAAAGTACCTGCTCTGTGGCGTGTAGTTTCTCCTCGGCCACCTAGGAACGGACCTTGTGTTTACG

Sequenz aus pcDNA3

E D D E Q D F M D E T P H I K E E P V D P C L E N K C

EcoR I

Not I

CGTCGGGGCAGTCGCTGTGTGCCGAATTCCAATGCCAGGGACGGCTACCAGTGCAAGTGCAAGCACGGCCAGCGGGCCG 4640  
GCAGCCCCGTCAGCGACACACGGCTTAAGGTTACGGTCCCTGCCGATGGTCACGTTACGTTTCGTGCCGGTCCGCGCCGGC

Sequenz aus pcDNA3

R R G S R C V P N S N A R D G Y Q C K C K H G Q R G R

CTACTGCGATCAAGGTGAGGGCAGCACTGAGCCCCAACAGTCACCGCGCGTCCACCTGTGCAAGGAGCAGGTGCGCG 4720  
GATGACGCTAGTTCCACTCCCCTCGTGACTCGGGGTTGTAGTGGCGCCGAGGTGGACAGCGTTCCTCGTCCACGCGC

Sequenz aus pcDNA3

Y C D Q G E G S T E P T V T A A S T C R K E Q V R

Xho I

AGTACTACACGGAGAACGACTGTGCTCGAGGCAGCCGTTGAAGTACGCCAAGTGCCTGGGCGGCTGCGGCAACCAGTGC 4800  
TCATGATGTGCCTCTTGCTGACAGCGAGCTCCGTCGGCAACTTCATGCGGTTACGCACCCGCCGACCCGTTGGTACG

Sequenz aus pcDNA3

E Y Y T E N D C R S R Q P L K Y A K C V G G C G N Q C

TGCGCGCCAAAATTGTGAGACGGCGCAAGGTGCGCATGGTGTGAGCAACAACCGCAAGTACATCAAGAACTTGGACAT 4880  
ACGCGCCGGTTTTAACACTCTGCCGCGTTCCACGCGTACCACACGTCGTTGTTGGCGTTCATGTAGTTCCTTGAACCTGTA

Sequenz aus pcDNA3

C A A K I V R R R K V R M V C S N N R K Y I K N L D I

CGTGCGCAAGTCCGATGCACCAAGAAATGCTACTGACTGAAAGATGCGACTACCCAATTGCTCGAACGGAGCAATAGCA 4960  
GCACGCGTTCACGCCTACGTGGTTCTTTACGATGACTGACTTTCTACGCTGATGGGTTAACGAGCTTGCCTCGTTATCGT

Sequenz aus pcDNA3

pcDNA3

V R K C G C T K K C Y . L K D A T T Q L L E R S N S

Not I

Xho I

Sph I

Xba I

Not I

GCTTAGATGTTAGTTTAGGAACAGGTTTATCCATCACACTGGCGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGCGGCCGCCACCGC 5040  
CGAATCTACAATCAAATCCTTGTCAAATAGGTAGTGTGACCGCCGGCAGCTCGTACGTAGATCTCGCCGCGGTGGCG

pcDNA3

pBS

S L D V S L G T G L S I T L A A A R A C I . S G R H R

Sac I

GGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGTTAATTTNGAGCTTGGC 5091  
CCACCTCGAGGTCGAAAACAAGGAAATCACTCCAATTAANCTCGAACCG

pBS

G G A P A F V P F S E V N ? E L G

## Danksagung

Diese Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. Christian Klämbt am Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster angefertigt.

Christian möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und seine Gemütsgeduld mit meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. W. Janning danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Ingrid Bunse, Karin Krukkert, Alexandra Mertens, Monika Föhlich, Alexandra Grimm und Elke Naffin bedanke ich mich für die vielen helfenden Hände im Laboralltag.

Ein besonderer Dank an meine langjährigen Wegbegleiter im Labor, Dirk Langehans und Uwe Lammel. Dirk danke ich für eine langjährige Freundschaft und die vielen lustigen Stunden auch außerhalb des Labors. Uwe danke ich für viele Anregungen, ein ständig offenes Ohr und die super Arbeitsatmosphäre über die vielen Jahre.

Vielen Dank an Jörn Hülsmeier, Tobias Stork, Liane Bolke und Gundula Edenfeld für viele Anregungen in fachlichen wie auch kulinarischen Fragen, eine ständige moralische Unterstützung und viele schöne Stunden auch außerhalb des Laboralltags.

Zudem bedanke ich mich bei den wechselnden und noch nicht erwähnten Kollegen in den Fliegenräumen, Steffi Gögel, Olliver Grewe, Sven Bogdan, Georg Steffes und Raiko Stephan für eine super Arbeitsatmosphäre

Lisa Westermann möchte ich für telefonische und digitale Unterstützung, sowohl der seelischen Verfassung, als auch in stilistischen Fragen danken.

Vielen dank auch an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der "AG-Klämbt" sowie an die "AG-Hummel".



# **Lebenslauf**

---

## **Jens Hillebrand**

---

Anschrift: Papenburger Str. 3  
48155 Münster  
Tel.: 0251-6093791  
E-Mail: hildeje@uni-muenster.de

Geburtsdatum: 11. Juni 1974  
Geburtsort: Iserlohn  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulausbildung**

---

08/1980 – 07/1984 Grundschule Sümmern  
08/1984 – 06/1993 Märkisches Gymnasium Iserlohn  
06/1993 Abitur

## **Zivildienst**

---

10/1993 – 10/1994 Zivildienst an der Körperbehindertenschule in Hemer

## **Studienverlauf**

---

10/1994 – 04/2000 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

09/1996 Vordiplom im Fach Biologie  
04/2000 Studienabschluß mit dem Diplom  
Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Funktion des Netrin Proteins bei der Bildung der Kommissuren in *Drosophila melanogaster*"

seit 05/2000 Promotion in der Biologie am Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie

Münster, den

---