

Westfälische Wilhelms-Universität

Münster

Fachbereich Biologie

-Institut für Neurobiologie-

Untersuchungen zu

***mummy, kette* und Interaktionspartnern**

bei der Entwicklung des *Drosophila* Nervensystems

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie

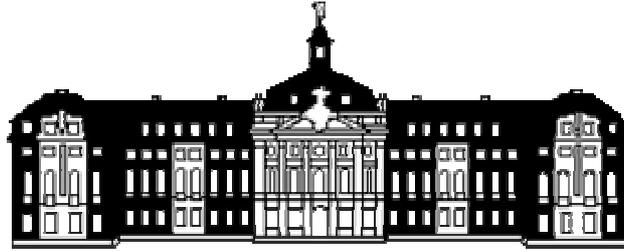
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Judith Mareike Strunk

Münster, im Oktober 2005



Westfälische Wilhelms-Universität

Münster

Fachbereich Biologie

-Institut für Neurobiologie-

Untersuchungen zu

***mummy, kette* und Interaktionspartnern**

bei der Entwicklung des *Drosophila* Nervensystems

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades

**der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

vorgelegt von

Judith Mareike Strunk

Münster, im Oktober 2005

Dekan:	Prof. Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Janning
Tag der mündl. Prüfung:	07. 12. 2005
Tag der Promotion:	16. 12. 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Morphologie und Entwicklung des embryonalen Nervensystems von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2	Das Gen <i>mummy</i>	4
1.3	Das Gen <i>kette</i>	6
1.4	Die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts	8
1.5	Die mechanosensorische Borste als Modell für AKTIN-Regulation während der Entwicklung	13
1.6	Ziel der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Puffer, Medien und Lösungen	17
2.1.3	Verwendete Antikörper	25
2.1.3.1	Primäre Antikörper	25
2.1.3.2	Sekundäre Antikörper	26
2.1.3.2.1	Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper	26
2.1.3.2.2	Fluoreszenz-Antikörper	26
2.1.4	Fliegenstämme	27
2.1.4.1	Wildtypstämme	27
2.1.4.2	Zweitchromosomale Mutationen	27
2.1.4.3	Drittchromosomale Mutationen	28
2.1.4.4	Multimarkerchromosomen	28
2.1.4.5	P-Element-Insertionslinien	29
2.1.4.6	EP-Linien	30
2.1.4.7	Gal4-Aktivatorlinien	30
2.1.4.8	UAS Effektorlinien	31
2.1.4.9	Balancer- und Markerstämme	32
2.1.4.10	FRT/FLP-Stämme	33
2.1.4.10.1	Zweitchromosomale FRT/FLP- Stämme	33
2.1.4.10.2	Drittchromosomale FRT/FLP- Stämme	33
2.1.4.11	Deletionsmutationen	34

2.1.4.11.1	X-Chromosomale Deletionsmutanten	34
2.1.4.11.2	Zweitchromosomale Deletionsmutanten	35
2.1.4.11.3	Drittchromosomale Deletionsmutanten	36
2.1.5	Verwendete Vektoren	37
2.1.6	Verwendete Oligonukleotide	37
2.1.7	Verwendete cDNA-Klone	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Genetische Methoden	38
2.2.1.1	Fliegenzucht	38
2.2.1.2	Sammeln von Embryonen	38
2.2.1.3	Komplementationsanalysen	38
2.2.1.4	Herstellung von Rekombinanten	38
2.2.1.5	Δ 2-3 Transposonexzisionsmutagenese	38
2.2.1.6	Klonale Analyse	40
2.2.1.6.1	Herstellung des neomycinhaltigen Futters	41
2.2.1.7	EMS-Mutagenese zur Generierung eines <i>kette</i> -FRT-Chromosoms	41
2.2.1.8	„male recombination“	43
2.2.1.9	F1-Modifier-Mutagenese	45
2.2.1.10	Interaktionspartnersuche mit Hilfe von Deletionen	46
2.2.1.11	Keimbahntransformation	47
2.2.1.11.1	Präparation der Embryonen	47
2.2.1.11.2	Injektion der Embryonen	47
2.2.1.11.3	Selektion transgener Fliegen	48
2.2.1.11.4	Lokalisation des Insertionsortes	48
2.2.2	Histologische Methoden	49
2.2.2.1	<i>whole-mount</i> Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	49
2.2.2.2	Nachweisreaktionen	50
2.2.2.2.1	Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung	50
2.2.2.2.2	Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung	50
2.2.2.3	Kutikula-Präparationen	50
2.2.2.4	Untersuchungen an Imaginalscheiben	51
2.2.2.4.1	Fixierung von Imaginalscheiben	51
2.2.2.4.2	Antikörperfärbung an Imaginalscheiben	51
2.2.2.5	Untersuchungen an Puppen	52

2.2.2.5.1	Präparation der Puppen	52
2.2.2.5.2	Fixierung der Puppen	52
2.2.2.5.3	Antikörperfärbungen an Puppen	53
2.2.2.5.4	Phalloidin-färbungen an Puppen	53
2.2.2.5.5	Einbettung von Puppen	53
2.2.2.6	Untersuchungen an „ <i>neuro muscular junctions</i> “ (NMJ)	53
2.2.2.6.1	Präparation der L3-Larven (Wanderlarven)	54
2.2.2.7	Untersuchungen an adulten Fliegen	54
2.2.2.7.1	Fliegenphotographie	54
2.2.2.7.2	Borstenpräparationen	55
2.2.2.8	Rasterelektronenmikroskopie	55
2.2.2.8.1	Vorbereitung von Fliegen für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	55
2.2.2.8.2	Goldbedampfung	56
2.2.2.9	<i>whole-mount in-situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	56
2.2.2.9.1	Fixierung der Embryonen	56
2.2.2.9.2	Herstellung von RNA-Proben	57
2.2.2.9.3	Hybridisierung	57
2.2.2.9.4	Nachweisreaktion	58
2.2.2.9.5	Einbetten von Embryonen nach <i>in-situ</i> Hybridisierung	58
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	58
2.2.3.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	58
2.2.3.2	Elektrotransformation kompetenter <i>E.coli</i> - Zellen	59
2.2.3.3	Behandlung von <i>cDNA</i> -Klonen	60
2.2.3.3.1	Lösung von DNA und Transformation in Zellen	60
2.2.3.3.2	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	60
2.2.3.3.2.1	„Kochmini“-Methode	60
2.2.3.3.2.2	„Boehringermini“-Methode	61
2.2.3.3.3	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	61
2.2.3.4	Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde	61
2.2.3.5	DNA-Restriktionen	62
2.2.3.6	Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel	62
2.2.3.7	Gelelektrophorese	62
2.2.3.8	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	62
2.2.3.9	Isolierung genomischer DNA	62

2.2.3.9.1	Isolierung genomischer DNA aus Fliegen: Salzfällungsmethode	62
2.2.3.9.2	Isolierung genomischer DNA für PCR: Einzelfliegenprotokoll	63
2.2.3.10	PCR	63
2.2.3.10.1	Reaktionskomponenten	64
2.2.3.10.2	Temperaturprofile	64
2.2.3.10.2.1	Programmschema „AMP“	65
2.2.3.10.2.2	Programmschema „LAMP“	65
2.2.3.10.2.3	Programmschema „LLAMP“	66
2.2.3.10.3	Inverse PCR	66
2.2.3.10.3.1	Einzelfliegen-Inverse-PCR	66
2.2.3.10.3.2	Programmschema „INV“	67
2.2.3.10.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	67
2.2.3.10.5	Klonierung von PCR-Produkten	67
2.2.3.11	Sequenzierungen	68
2.2.4	Biochemische Methoden	68
2.2.4.1	<i>Western Blot</i> -Analyse	68
2.2.4.1.1	Gewinnung der Proteinprobe aus Embryonen oder Larven	68
2.2.4.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	69
2.2.4.1.3	Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels (Bio-Rad System)	69
2.2.4.1.4	Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese	70
2.2.4.1.5	Gelelektrophorese	70
2.2.4.1.6	Transfer auf die Membran	71
2.2.4.1.7	Nachweis von Proteinen über Antikörperfärbung	71
2.2.5	Zellkultur	72
2.2.5.1	Kultivierung von S2-Zellen	72
2.2.5.1.1	Antikörperfärbung an S2-Zellen	72
2.2.5.2	Transfektion von S2-Zellen	73
3	Ergebnisse	74
3.1	Untersuchungen zum Gen <i>mummy</i> (<i>mmy</i>)	74
3.1.1	Die Kartierung auf Basis von „male recombination“	74
3.1.2	Kartierung über Deletionsmutanten	75
3.1.3	Transposonexzisionsmutagenese von DLP ^{KG01694}	77
3.1.4	Untersuchung des <i>CG9535</i> anhand eines sequenzierten Allels	77

3.1.5	Analyse eines möglichen Einflusses von <i>mummy</i> auf die GPI-Anker-Synthese	78
3.1.6	Analyse des Einflusses von <i>mummy</i> auf die Glycosylierung	82
3.2	Untersuchungen zum Gen <i>kette</i>	84
3.2.1	Funktionelle Analyse in adulten Geweben	84
3.2.1.1	Generierung des <i>kette</i> -FRT-Chromosoms durch EMS-Mutagenese	84
3.2.1.2	Generierung des <i>kette</i> -FRT-Chromosoms durch „male recombination“	85
3.2.1.3	Klonale Analyse der <i>kette</i> -Funktion im Auge	86
3.2.1.4	Rettung des <i>kette</i> -FRT-Phänotyps im Auge	88
3.2.1.5	Erstellung eines <i>kette</i> RNAi-Konstruktes	88
3.2.1.6	Untersuchung des <i>kette</i> RNAi-Effektes auf verschiedene Gewebe	90
3.2.2	Suche nach Interaktionspartnern auf genetischer Basis	92
3.2.2.1	Beeinflussung des <i>kette</i> - <i>Escaper</i> -Phänotyps durch Deletionen und <i>P</i> -Element-Insertionen	92
3.2.2.2	Modifierscreen zur Identifizierung von KETTE-Interaktionspartnern	94
3.2.2.3	Auswirkungen von Deletionen auf den Phänotyp der <i>GMRGal4</i> ; UAS <i>kette</i> ^{myr} -Fliegen	95
3.2.2.3.1	Defizienzen, die zu einer Abschwächung des <i>GMRGal4</i> ; UAS <i>kette</i> ^{myr} -Phänotyps führen	96
3.2.2.3.2	Defizienzen, die zu einer Verstärkung des <i>GMRGal4</i> ; UAS <i>kette</i> ^{myr} -Phänotyps führen	98
3.2.3	Untersuchungen AKTIN-abhängiger Prozesse	101
3.2.3.1	Der Einfluss von <i>kette</i> und <i>Sra-1</i> auf die Ausbildung der neuromuskulären „Junction“ (NMJ)	101
3.2.3.2	Der Interaktionspartner DREADLOCKS (DOCK)	103
3.2.3.2.1	Verwendete UAS- <i>dreadlocks</i> (<i>dock</i>)-Konstrukte	103
3.2.3.2.2	Analyse des Effektes auf <i>S2R+</i> -Zellen	104
3.2.3.2.3	Phänotypische Analyse der mit <i>scaGal4</i> getriebenen Insertionen	106
3.2.3.2.3.1	Analyse des Effektes auf die mechanosensorischen Borsten	109
3.2.3.2.3.2	Analyse des Effektes auf die frühe Borstenentwicklung	113
3.2.3.2.3.3	Analyse des Effektes auf die thorakalen Haare	114
3.2.3.2.3.4	Analyse des Effektes auf die Flügel	115
3.2.3.2.3.5	Analyse des Effektes auf die Augen	116

3.2.3.2.3.6	Dosiseffekt des <i>dock^{myr}</i> #51-6-Konstruktes	116
3.2.3.2.3.7	Analyse gespaltener Borsten	117
3.2.3.2.4	Genetische Interaktionsstudien mit <i>wave</i> und <i>wasp</i>	119
3.2.3.2.5	Interaktionsstudien anhand des Konstruktes <i>wasp^{ACA}</i>	121
4	Diskussion	123
4.1	<i>mummy</i> kodiert eine <i>Drosophila</i>-UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN PYROPHOSPHORYLASE	123
4.1.1	Die Phänotypen von <i>mummy</i> sind auf den Verlust von UDP-N-Acetylglucosamin zurückzuführen	124
4.1.2	Die Funktion von <i>mummy</i> bei der Glycosylierung von Proteinen	125
4.1.3	Der Einfluss von <i>mummy</i> auf die GPI-Ankersynthese	127
4.2	Identifizierung von KETTE-Interaktionspartnern <i>in vivo</i>	129
4.3	Der Zelltod des <i>kette</i>-mutanten Gewebes bei der klonalen Analyse ist nicht auf die Funktion von <i>kette</i> zurückzuführen	130
4.4	KETTE, SRA-1 und DOCK sind für AKTIN-abhängige Prozesse von Bedeutung	132
4.4.1	KETTE und DOCK verändern die AKTIN-abhängige Morphologie der mechanosensorischen Borsten	133
4.4.1.1	Die Entwicklung der mechanosensorischen Borste	133
4.4.1.2	Die Expression von <i>kette</i> RNAi führt zu dünneren Borsten und reduzierter AKTIN-Polymerisation	135
4.4.1.3	Die Überexpression von membranassoziiertem DOCK hat eine verstärkte AKTIN-Polymerisation zur Folge	136
4.4.1.4	Die Entwicklung der Mikrochaeten wird von der <i>dock^{myr}</i> -Überexpression beeinflusst	138
4.4.1.5	Die SH3-Domänen von DOCK zeigen partielle funktionelle Redundanz	139
4.4.1.6	Die erhöhte AKTIN-Polymerisation durch Überexpression von membranassoziiertem DOCK führt zu multiplen epidermalen Haaren	140
4.4.2	<i>kette</i> und <i>Sra-1</i> verändern die synaptische Architektur	141
4.4.3	KETTE und DOCK verändern die Anzahl der mechanosensorischen Borsten	142
4.4.3.1	Die Spezifizierung der Borsten	142
4.4.3.2	Die Expression von <i>kette</i> RNAi führt zu einem Verlust der Borsten	144

4.4.3.3	In welcher Entwicklungsphase ist KETTE von Bedeutung?	145
4.4.3.4	Die Überexpression von membranassoziiertem DOCK beeinflusst die Anzahl der Makrochaeten	147
4.4.3.5	DOCK ist für die WASP-abhängige AKTIN-Polymerisation während der Spezifizierung von Borsten von Bedeutung	148
4.4.4	DOCK ist ein membranrekrutierender Faktor des KETTE/ABI/SRA-1-Proteinkomplexes während der Borstenentwicklung	149
5	Zusammenfassung	151
6	Literatur	152
7	Anhang	

1 Einleitung

Für die Entwicklung eines komplexen Organismus ist nicht nur das fehlerlose Zusammenspiel und die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen von essentieller Bedeutung, sondern auch vielschichtige Stoffwechsel- und Signalprozesse innerhalb der Zellen. Die Steuerung dieser Abläufe erfordert unzählige Proteine, deren Funktion und Expression genau aufeinander abgestimmt ist. Die Regulation des Zytoskeletts, das unter anderem für Zellbewegung, Zellform und Zellteilung aber auch für Transportprozesse in den Zellen benötigt wird, ist dabei von zentraler Wichtigkeit. Auch für die Entwicklung des Nervensystems sind diese Prozesse besonders relevant. Das embryonale Nervensystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* bietet sich als Modell an, da es bereits in vielerlei Hinsicht gut charakterisiert ist (Campos-Ortega, 1993; Goodman und Doe, 1993).

1.1 Morphologie und Entwicklung des embryonalen zentralen Nervensystems von *Drosophila melanogaster*

Das zentrale Nervensystem des *Drosophila melanogaster* Embryos ist in zwei Hirnhemisphären und das Ventralganglion gegliedert, welches auf der ventralen Seite des Embryos lokalisiert ist und drei Thorax- und acht Abdominalsegmente umfasst, die aus segmentalen Ganglien oder Neuromeren bestehen. Aufgrund der besonderen Form der Hauptaxonbahnen wird das Nervensystem häufig mit einer Strickleiter verglichen. Der Ursprung des Nervensystems ist die sogenannte neurogene Region, die sich während der Entwicklung des Embryos im zellulären Blastodermstadium bildet. Alle zweitausend Zellen dieser Region haben das Potential neuronale Zellen zu werden. Tatsächlich werden aber durch den Prozess der lateralen Inhibition pro Hemisegment nur 30 Zellen selektioniert, die sich zu Neuroblasten differenzieren, während die übrigen Zellen ein epidermales Schicksal erfahren. Nach der Invagination des Mesoderms in Stadium 10 delaminieren die Neuroblasten stufenweise in den Raum zwischen Mesoderm und Ektoderm im Inneren des Embryos (Campos-Ortega, 1993), wo sie sich mehrmals stammzellartig teilen und so ca. 350 Neurone und 30 Gliazellen pro Hemisegment generieren (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997), deren

Zellstammbäume vollständig beschrieben sind (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999). Ein weiterer Teil des ZNS, die sogenannte Mittellinie, entsteht aus zwei mesektodermalen Zellreihen, die durch die Mesoderminvagination an der ventralen Seite des Embryos zusammengeführt werden und während der Keimstreifverlängerung eine durchgehende Zellreihe von sieben bis acht Mittellinienstammzellen pro Segment bilden. Diese Vorläuferzellen delaminieren nicht vollständig in die Ebene der Neuroblasten, sondern verbleiben durch filigrane cytoplasmatische Fortsätze verankert (Bossing und Technau, 1994; Klämbt und Goodman, 1991).

Aus den Mittellinienvorläuferzellen entstehen verschiedene Klassen von Neuronen, MP1-, UMI-, VUM- Neurone, die Nachkommen des medianen Neuroblasten (MNB), sowie bis zu vier Mittelliniengliazellen (Jacobs und Goodman, 1989; Klämbt *et al.*, 1991; Bossing *et al.*, 1994). Diese Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Musterbildung im ZNS, da sie für die Sezernierung von Signalmolekülen wie SLIT und NETRIN verantwortlich sind (Kennedy *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1994; Brose *et al.*, 1999; Brose und Tessier-Lavigne, 2000). Als terminaler Vorgang der Musterbildung im ZNS werden die in enger räumlicher Beziehung stehenden Kommissuren durch Interkalation zweier Mittelliniengliazellen voneinander getrennt. Eine Reihe von Genen ist für die korrekte Ausführung dieser Trennung essentiell und Mutationen dieser Gene führen zu einem sogenannten „fusionierte Kommissuren“-Phänotyp (Klämbt *et al.*, 1991; Hummel, 1998).

Gegenstand dieser Arbeit sind zwei Gene, *kette* und *mummy*, deren Phänotyp sich im embryonalen ZNS ähnlich ausprägt (Abb. 1), obwohl die Defekte bei der Musterbildung nicht auf gleicher molekularer Ursache beruhen und die entsprechenden Genfunktionen zum Teil sogar in unterschiedlichen Zelltypen benötigt werden. Mutationen in beiden Genen haben die Fusion der beiden segmentalen Kommissuren sowie eine Reduktion der longitudinalen Konnektive zur Folge (Schimmelpfeng, 2000; Hummel, 1998). Das Erscheinungsbild des ZNS wirkt daher insgesamt schmaler (Abb.1).

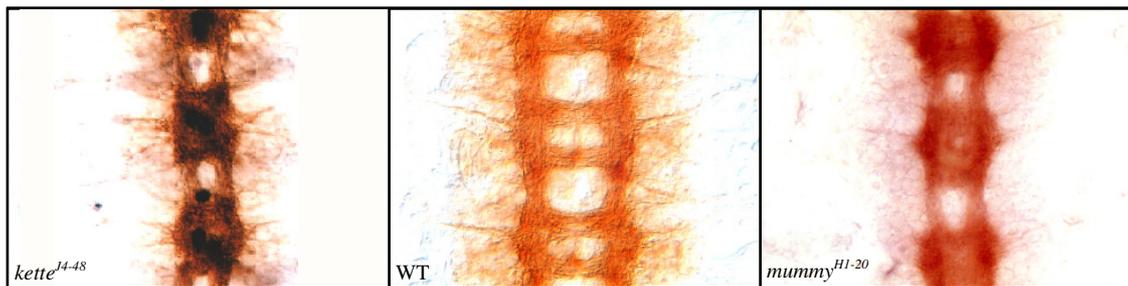


Abb. 1: ZNS-Phänotypen der *kette*- und *mummy*-Mutationen in Homozygose im Vergleich zum Wildtyp, gefärbt mit dem MAB BP102 und anschließender HRP-Immunohistochemie, anterior ist oben. Man erkennt deutlich die fusionierten Kommissuren. Im Fall von *kette* sind die Mittelliniengliazellen zusätzlich durch die Enhancertraplinie AA142 markiert und mit anschließender AP-Immunohistochemie sichtbar gemacht (Abb. modifiziert nach Hummel, 1998 und Strunk, 2001).

Es existieren aber auch eine Reihe phänotypischer Unterschiede. Mutationen im Gen *kette* beeinträchtigen die Migration der Mittelliniengliazellen, die nicht wie in der wildtypischen Situation posterior zwischen die trennenden Kommissuren wandern, sondern die Mittellinie in lateraler Richtung verlassen (Abb. 4). Dieser Defekt beruht nicht auf einer Störung der Gliazellen selbst, sondern auf Projektionsdefekten der VUM-Neurone, deren axonale Fortsätze das Migrationssubstrat für die Mittelliniengliazellen bilden. Die Spezifizierung der Mittelliniengliazellen scheint dagegen nicht beeinflusst zu sein (Hummel, 1998). Eine zygotische Expression von *kette* ist ab dem Stadium 11 in der Mittellinie nachweisbar.

Mutationen im Gen *mummy* führen dagegen zu einer leichten Reduktion der Anzahl von Mittelliniengliazellen, deren Wanderung gestört ist und die gegen Ende der Embryogenese in ventraler Richtung verschoben werden (Schimmelpfeng, 2000). Die Ursache dieses Phänotyps scheint jedoch nicht in einer Fehlprojektion der VUM-Neurone zu liegen (Schimmelpfeng, 2000). Eine Veränderung der Anzahl der Neurone konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, so dass keine neuronalen Differenzierungsdefekte vorzuliegen scheinen (Schimmelpfeng, 2000). Es treten jedoch auch Defekte in der Faszikelbildung auf (Abb. 2). Genetische Untersuchungen an Doppelmutanten lassen für *mummy* eine Funktion in den Mittellinienneuronen und den Mittelliniengliazellen vermuten. Die grundlegenden Differenzierungsprozesse scheinen nicht beeinflusst, aber möglicherweise ist *mummy* an der Kontrolle der Wanderungsprozesse beteiligt (Schimmelpfeng, 2000).

1.2 Das Gen *mummy*

Neben den Defekten bei der Musterbildung im ZNS wurden in *mummy*-Mutanten eine Reihe weiterer fehlerhafter Entwicklungsprozesse beobachtet. Der prominenteste Defekt betrifft einen anderen Migrationsprozess, den dorsalen Schluss der Epidermis. Ungefähr 11 Stunden nach der Eiablage ist der Prozess des Keimstreifrückzugs beendet und die dorsale Region des Embryos von der Amnioserosa bedeckt. Die dorsolateralen Zellen der Epidermis strecken sich und wandern in dorsaler Richtung um die Epidermis zu schließen. Dieser Prozess ist mit Veränderungen der Zellform verbunden und geht vollständig ohne Zellproliferation vor sich (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Martinez-Arias, 1993; Young et al., 1993). In *mummy*-mutanten Embryonen ist der dorsale Schluss defekt und die Embryonen bleiben dorsal geöffnet, weshalb das Gen ursprünglich auch unter dem Namen *cabrio* identifiziert wurde (Abb. 2) (Schimmelpfeng, 2000).

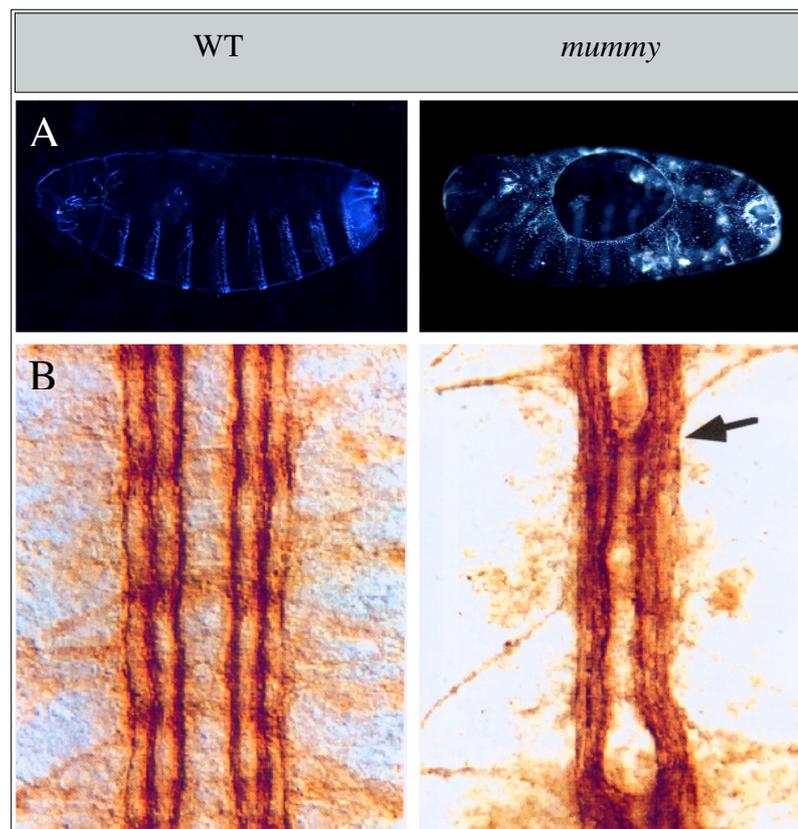


Abb. 2: Vergleich des *mummy*-Phänotyps mit der wildtypischen Situation. (A) dorsolaterale Ansicht von Kutikula-Präparationen, anterior ist links. In *mummy*-mutanten Embryonen erkennt man deutlich ein dorsales Loch. (B) Immunhistochemie mit MAB FasII an embryonalen Zentralnervensystemen, anterior ist oben. Die Faszikel sind zur Mittellinie verschoben und einzelne Axone kreuzen die Mittellinie (Pfeil). (Abb. entnommen aus Schimmelpfeng, 2000 und Strunk, 2001)

Zudem treten weitere Differenzierungs- und Pigmentierungsdefekte der Kutikula auf (Schimmelpfeng, 2000). 1984 wurde in einem Screen von Christiane Nüsslein-Volhard und Kollegen die Mutante namens *mummy* (*mmy*) entdeckt, die kutikuläre Veränderungen der gleichen Art aufwies, die auch bei *cabrio* beobachtet wurden (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). Obwohl die *mummy*-Mutation ursprünglich nicht mit Defekten beim dorsalen Schluss beschrieben wurde, konnten anhand von Kutikulapräparationen Löcher in der dorsalen Kutikula nachgewiesen werden (Schimmelpfeng, 2000). Genetische Untersuchungen haben die Allelität der beiden unabhängig isolierten Mutationen bestätigt (Schimmelpfeng, 2000). In der weiteren Arbeit wird daher die Bezeichnung *mummy* verwendet.

Bei der Regulation des dorsalen Schlusses ist die JUN-N-terminale-Kinase-Kaskade (JNK), deren Mitglieder die Expression von *decapentaplegic* (*dpp*) in der „leading edge“ steuern, von besonderer Bedeutung (Glise *et al.*, 1995; Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Zeitlinger *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 1997; Kockel *et al.*, 1997; Riesgo-Escovar und Hafen, 1997 (a & b); Martin-Blanco *et al.*, 1998; Ring und Martinez-Arias, 1993; Sluss *et al.*, 1996; Noselli, 1998; Harden *et al.*, 1999; Noselli und Agnes, 1999, Xia und Karin, 2004) (Abb. 3).

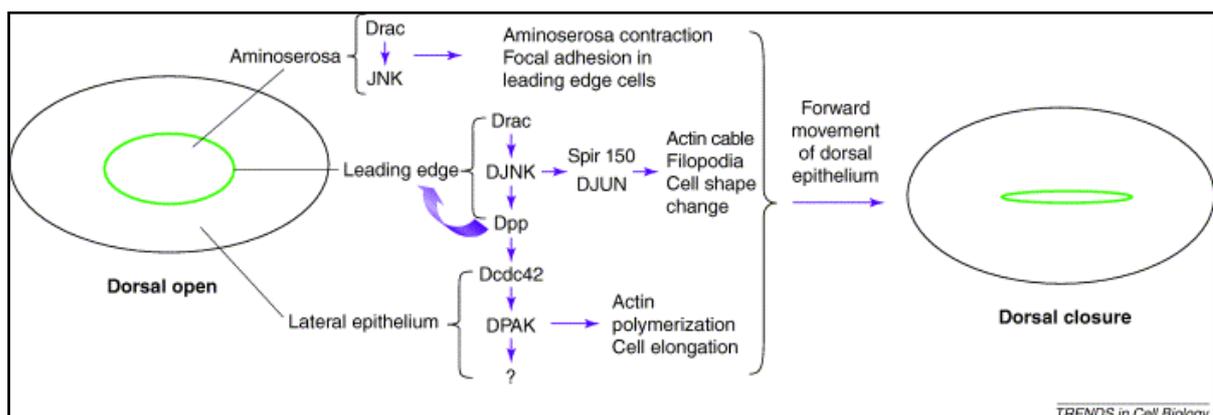


Abb. 3: Regulation des dorsalen Schlusses (Abb. entnommen aus Xia und Karin, 2004)

Der DPP-Gradient aktiviert die *dpp*-Signalkaskade, die für den korrekten dorsalen Schluss ebenfalls essentiell ist, wie Verlustmutationen der Signalwegkomponenten zeigen (Affolter *et al.*, 1994; Nellen *et al.*, 1994; Penton *et al.*, 1994; Arora *et al.*, 1995; Letsou *et al.*, 1995; Staehling-Hampton *et al.*, 1995; Ruberte *et al.*, 1995; Simin *et al.*,

1998; Affolter *et al.*, 2001). In *mummy*-mutanten Embryonen kann eine Reduktion der Expression von Zielgenen der Kaskade wie *dpp* und *puckered* (*puc*) beobachtet werden (Schimmelpfeng, 2000), was eine Funktion von *mummy* im JNK-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich macht (Schimmelpfeng, 2000).

Die Funktion von *mummy* in adulten Geweben ist noch weitgehend unklar. Für die Augenentwicklung ist nach Induktion homozygoter Klone in Augenimaginalscheiben ein Phänotyp beschrieben worden, der eine verfrühte Spezifizierung der Photorezeptorzellen sowie eine gestörte räumliche Anordnung derselben beinhaltet (Schimmelpfeng, 2000; Strunk, 2001). Zudem konnten Auswirkungen auf die *dpp*-Expression in der morphogenetischen Furche nachgewiesen werden (Strunk, 2001). Entgegen den Beobachtungen beim dorsalen Schluss ist die *dpp*-Expressionsdomäne jedoch verbreitert und unregelmäßig, was eine direkte Rolle von *mummy* im JNK-Signalweg in Frage stellt.

Die genaue Funktion von *mummy* und ihr Wirkungsort waren aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse unklar.

1.3 Das Gen *kette*

Das auf dem dritten Chromosom bei 79E-F gelegene Gen *kette* kodiert ein ursprünglich als *Drosophila*-Homolog zu den HEM-2/NAP1-Proteinen isoliertes, evolutionär konserviertes Protein (Baumgartner *et al.*, 1995). Die Mitglieder der HEM-Proteinfamilie aus *Drosophila* und Säugern sind untereinander bis zu 70% identisch und haben eine konservierte Länge von 1118-1126 Aminosäuren. Der Verlust der *kette*-Genfunktion beeinträchtigt nicht nur die Ausbildung des Nervensystems (Abb. 4), sondern führt auch zu einer Reduktion der Anzahl an Muskelfasern sowie einer Störung der Mitteldarmmorphologie. Zudem konnte ein Effekt auf die subzelluläre Verteilung von F-Aktin beobachtet werden (Hummel *et al.*, 2000) (Abb. 4). Alle genetisch möglichen Kombinationen mit dem Allel *kette*^{A2-6} führen in Transheterozygose zum Auftreten sogenannter „Escaper“, deren Phänotypen von rauen Augen über zusätzliche Flügelvenen bis hin zu gebogenen, gewellten oder geknickten Borsten reichen (Hummel, 1998). Genetische und biochemische Untersuchungen haben

bereits potentielle Interaktionspartner von *kette* aufgedeckt (Eden *et al.*, 2002; Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004).

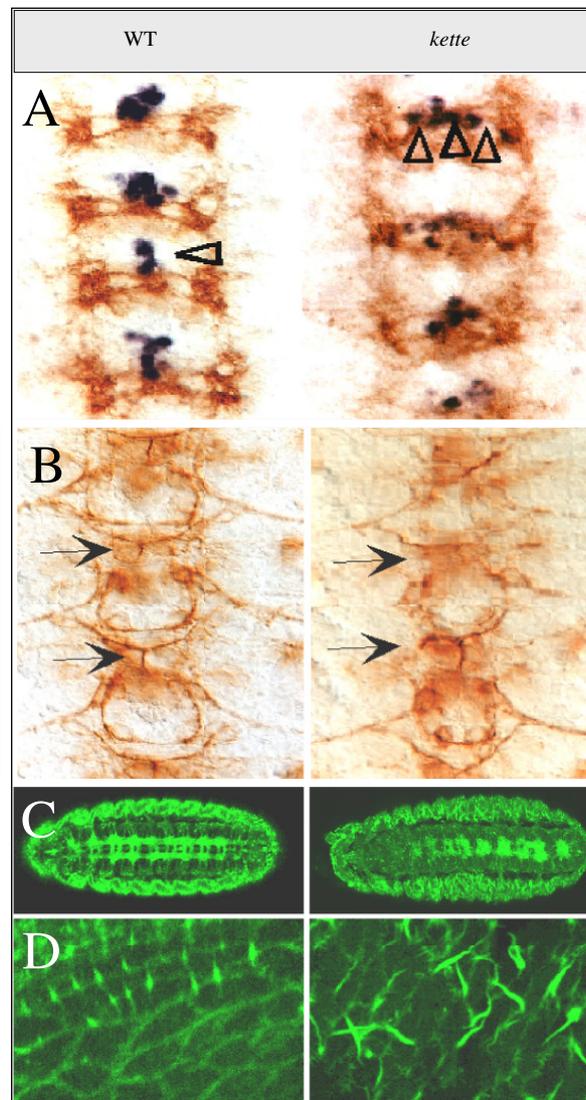


Abb. 4: Vergleich des *kette*-Phänotyps mit der wildtypischen Situation. (A, B) Immunhistochemie an embryonalen ZNS-Präparationen mit MAB BP102 und PAB α - β -Galactosidase. (C, D) Darstellung des Aktins anhand von Moesin-GFP. (A) Deutlich ist die Mislokalisierung der Gliazellen zu erkennen (Pfeilspitzen). (B) Dem Migrationsdefekt der Gliazellen liegen Projektionsdefekte der VUM-Neurone zugrunde (Pfeil). (C) Bei Aufsicht auf den Embryo erkennt man die fusionierten Kommissuren im ZNS, sowie Organisationsdefekte in der Epidermis, die in höherer Auflösung (D) verdeutlicht werden.

Biochemische Interaktionsstudien wiesen das SH2-SH3-Adapterprotein NCK als Interaktionspartner von NAP1 aus (Kitamura *et al.*, 1996). Dem *Drosophila*-NCK-Homolog *dreadlocks* (*dock*) kommt eine Rolle bei der axonalen Wegfindung und Zielerkennung der Photorezeptoraxone und Motoneurone zu (Garrity *et al.*, 1996; Desai *et al.*, 1999). Es bindet die Kinase PAK, die ihrerseits kleine GTPasen der RHO-Familie wie RHO, RAC und CDC42 binden kann. Diese GTPasen sind bei der Übertragung von Wegweisungsinformationen auf das AKTIN-Zytoskelett von essentieller Bedeutung (Luo *et al.*, 1994; Zipkin *et al.*, 1997). Die genetische Interaktion zwischen KETTE und DOCK konnte für die axonale Wegfindung der Photorezeptoraxone gezeigt werden (Hummel *et al.*, 2000). Der Phänotyp der hypomorphen *kette*-Mutante wird durch Reduktion der Gendosis von *dock* deutlich verstärkt und vice versa.

Auch die Interaktion mit den kleinen GTPasen der RHO-Familie ist im Hinblick auf den AKTIN-Phänotyp von *kette* besonders interessant. Die Expression von *rac* in Mittellinienzellen führt zu einer partiellen Rettung des *kette*-Phänotyps (Hummel *et al.*, 2000).

1.4 Die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts

Die korrekte Regulation des AKTIN-Zytoskeletts ist von zentraler Bedeutung für alle Migrationsprozesse, aber auch für Zellteilung, Zellmorphologie und Zell-Zell-Interaktionen. Eine Vielzahl von Proteinen ist daher daran beteiligt. AKTIN kommt in der Zelle in zwei verschiedenen Formen vor, als monomolekulares G-AKTIN (globuläres AKTIN) und als polymeres F-AKTIN (filamentöses AKTIN). Zur Erzeugung eines AKTIN-Filamentes wird zunächst mit Hilfe enzymatischer Katalyse ein AKTIN-Trimer gebildet (Pollard, 1986; Sept und McCammon, 2001), das durch Anlagerung von G-AKTIN an beide Enden wächst. Das Wachstum wird von den verschiedenen Dissoziationskonstanten für die unterschiedlichen nucleotidgebundenen G-AKTIN-Formen, ATP-AKTIN und ADP-AKTIN, bestimmt, was ein Nettowachstum in Richtung des so genannten Plus-Endes zur Folge hat (Pollard und Borisy, 2003). Am Minus-Ende findet die Depolymerisation statt. So entsteht ein polarisiertes Filament. Um schnell und effektiv auf veränderliche Situationen, wie z.B. Signalmoleküle, reagieren

zu können, benötigt die Zelle eine geschwindigkeitsoptimierte Regulation der normalerweise langsam ablaufenden Polymerisations- und Depolymerisationsprozesse. Ein für die Filamentbildung wichtiger Katalysator ist der ARP2/3-Komplex (ACTIN RELATED PROTEIN 2/3) (Millard *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2004; Pollard und Borisy, 2003; Welch und Mullins, 2002), der aus sieben assoziierten Proteinen besteht: ARP2 und ARP3 sowie die Proteine ARPC1-5 (ARP2/3 COMPLEX COMPONENT 1-5) (Millard *et al.*, 2004; Pollard und Borisy, 2003; Welch und Mullins, 2002). Als Modell für die katalytische Wirkung des ARP2/3-Komplexes ist anhand von Röntgenstrukturanalyse des inaktiven Komplexes der folgende Ablauf vorgeschlagen worden: Die kinetisch ungünstige Bildung eines AKTIN-Trimers als Startpunkt eines Filamentes wird von dem Komplex, der G-AKTIN binden kann, simuliert und damit die *de novo*-Nukleation von F-AKTIN angeregt (Robinson *et al.*, 2001). Auch Verzweigungen bestehender AKTIN-Filamente werden vom ARP2/3-Komplex vermittelt (Millard *et al.*, 2004; Pollard und Borisy, 2003, Welch und Mullins, 2002). Die Aktivität des ARP2/3-Komplexes wird wiederum von verschiedenen Faktoren gesteuert. Die in dieser Hinsicht bedeutsamsten Regulatorproteine gehören der WASP-Proteinfamilie an, die sich in zwei Untergruppen gliedern lässt: die WASP-Proteine und die WAVE/SCAR-Proteine (Millard *et al.*, 2004; Pollard und Borisy, 2003; Stradal *et al.*, 2004; Suetsugu *et al.*, 2002) (Abb. 5). Zudem sind die kleinen GTPasen der RHO-Familie, CDC42 und RAC maßgeblich an der Regulation beteiligt. Nach Aktivierung von WASP durch CDC42 kann vornehmlich Filopodienbildung und nach Aktivierung von WAVE durch RAC hauptsächlich Lamellipodienbildung beobachtet werden (Abb. 5) (Hall, 1998; Miki *et al.*, 1998; Takenawa und Miki, 2001). Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die WASP/WAVE-Proteine die aktivierenden Signale der kleinen GTPasen an den ARP2/3-Komplex übertragen und so die F-AKTIN-Bildung stimulieren (Suetsugu und Takenawa, 2003; Pollard und Borisy, 2003; Stradal *et al.*, 2004; Bompard und Caron, 2004).

In Säugetieren existieren zwei WASP-Proteine, die nach dem *Wiskott-Aldrich Syndrom* benannt wurden. Eines davon, N-WASP, besitzt die gleiche Domänenstruktur wie das einzig bekannte *Drosophila* Homolog WASP. Die am C-Terminus des Proteins gelegene VCA-Domäne (verprolin homology domain; cofilin-homology domain; acidic region)

ist sowohl notwendig wie auch hinreichend für die ARP2/3-induzierte AKTIN-Polymerisation (Miki und Takenawa, 2003; Millard *et al.*, 2004; Stradal *et al.*, 2004). Neben G-AKTIN und ARP2/3 kann das Protein auch CDC42 über eine CRIB-Domäne direkt binden sowie mit weiteren Faktoren wie PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphat) und den SH3-Domänen anderer Proteine interagieren (Prehoda *et al.*, 2000; Higgs und Pollard, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000). Der komplette Mechanismus der WASP-Aktivierung ist noch unklar, jedoch wurde WASP in einer autoinhibitorischen Konformation gefunden, in der die CRIB-Domäne das VCA-Modul maskiert und auf diese Weise eine Bindung und Aktivierung des ARP2/3-Komplexes verhindert. Die Bindung von GTP-CDC42 an die CRIB-Domäne bewirkt eine Konformationsänderung, die das VCA-Modul für die Interaktion mit ARP2/3 freistellt und die Bildung von Filopodien induziert (Miki *et al.*, 1998a; Rohatgi *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Higgs und Pollard, 2001; Pollard und Borisy, 2003; Millard *et al.*, 2004).

Es ist jedoch auch eine CDC42-unabhängige Funktion von WASP beschrieben worden (Tal *et al.*, 2002) und die Aktivierung durch Phosphorylierung oder Bindung von SH3-Domänen ist bekannt (Cory *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Suetsugu *et al.*, 2002). Die Auflösung der Autoinhibition ist daher ein verhältnismäßig einfaches Model, während andere Daten für eine komplexere Regulation, durch Bindung von WIP/CR16 und TOCA-1 sprechen (Ho *et al.*, 2001; Martinez-Quiles *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004). WIP (WASP INTERACTING PROTEIN) oder das verwandte Protein CR16 binden an N-WASP und stabilisieren vermutlich die autoinhibierende Konformation, während TOCA-1 aktivierend wirkt (Ho *et al.*, 2001; Martinez-Quiles *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004). Diese Aktivierung könnte direkt durch Destabilisierung des inhibitorischen Komplexes oder indirekt durch Antagonisierung der supressorischen Wirkung von WIP erfolgen (Ho *et al.*, 2004).

Wie auch bei WASP hat die Untergruppe der WAVE/SCAR-Proteine in Säugetieren mehrere bekannte Mitglieder, während aus *Drosophila* nur ein Protein bekannt ist (Pollard und Borisy, 2003; Suetsugu und Takenawa, 2003; Bompard und Caron, 2004; Millard *et al.*, 2004; Stradal *et al.*, 2004). Auch die WAVE-Proteine besitzen die C-terminale VCA-Domäne, haben aber im Gegensatz zu WASP keine CRIB-Domäne, so dass sie nicht direkt mit kleinen GTPasen interagieren können (Abb. 5).

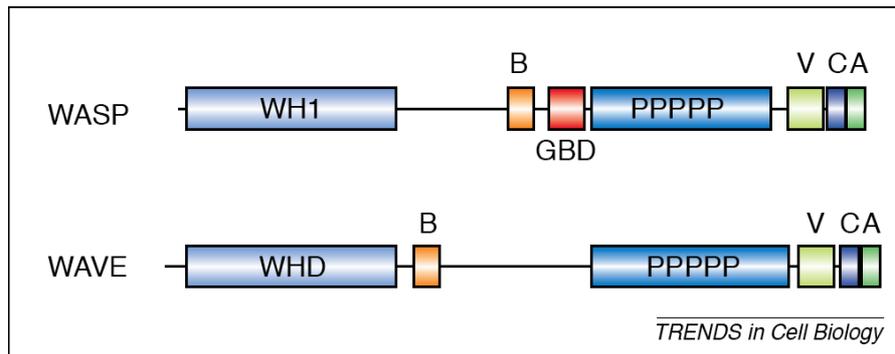


Abb. 5: Darstellung der Struktur von WASP und WAVE. WHD-wave-homology domain, WH1-wasp homology 1 domain; B-basic domain; GBD-GTPase-binding domain; PPPPP-proline rich region; V-verprolin homology domain; C-cofilin-homology domain; A-acidic region

Es konnte jedoch eine Interaktion von WAVE mit RAC nachgewiesen werden (Miki *et al.*, 1998; Miki *et al.*, 2000), was einen anderen Regulationsmechanismus als den für WASP beschriebenen wahrscheinlich macht. Ein Proteinkomplex aus vier Proteinen, dessen eine Komponente das KETTE-Homolog NAP1 ist, wurde in Zusammenhang mit der WAVE-Regulation beschrieben (Eden *et al.*, 2002) und einige der direkten Protein-Protein-Bindungen innerhalb des Komplexes aufgedeckt (Tsuboi *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2002). Die bisherigen Daten, die Aufschluss über die Kontrolle der WAVE-Aktivität geben, sind jedoch widersprüchlich und werfen kontroverse Hypothesen auf (Eden *et al.*, 2002; Steffen *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004).

So besagen einige Daten, dass das normalerweise konstitutiv aktive WAVE keine ARP2/3-abhängige Stimulation der F-AKTIN-Bildung zeigt, wenn es mit NAP1 (Nck associated protein 1), PIR121/SRA-1 (p53-inducible mRNA/specifically rac associated protein 1), ABI2 (abelson interactor 2) und HSPC300 (haemopoietic stem progenitor cell 300) assoziiert vorliegt. Diese Inhibition kann durch Zugabe von GTP-RAC oder dem SH2/SH3-adapter Protein NCK aufgehoben werden, da der Komplex in diesem Fall dissoziiert und nur die HSPC300-Einheit mit WAVE verbunden bleibt. Der Teilkomplex HSPC300-WAVE kann AKTIN-Polymerisation in *in-vitro-Assays* aktivieren (Eden *et al.*, 2002). Aus diesen Daten ergibt sich ein Transinhibitionsmodell, dem die Vorstellung zugrunde liegt, WAVE werde von den beschriebenen vier Proteinen in einem inaktiven Komplex gehalten und könne erst durch Dissoziation des Komplexes

Aktivität entfalten und AKTIN-Polymerisation erwirken (Abb. 6). Genetisch wird dieses Modell durch Daten aus *Dictyostelium* und *Drosophila* unterstützt. Verlustmutationen von *pirA*, dem *Dictyostelium*-Homolog von *Sra-1*, führen zu einer erhöhten WAVE-Aktivität, die eine erhöhte Filamentbildung zur Folge hat. Dieser Effekt wird in einem WAVE-mutanten Hintergrund reprimiert (Blagg *et al.*, 2003). Ähnlich verhält es sich mit der in *kette*-Mutanten beobachteten zytosolischen Akkumulation von AKTIN, die durch Reduktion der WAVE-Genexpression reduziert wird (Bogdan und Klämbt, 2003). Beide Untersuchungen sprechen für eine negative Regulation von WAVE durch Komponenten des Komplexes. Die Korrektheit dieser Hypothesen wird jedoch durch Daten in Frage gestellt, die eine Dissoziation des Komplexes ausschließen und ihm eine Rolle als potentiell positiver Regulator der WAVE-Aktivität zuweisen (Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004) (Abb. 6).

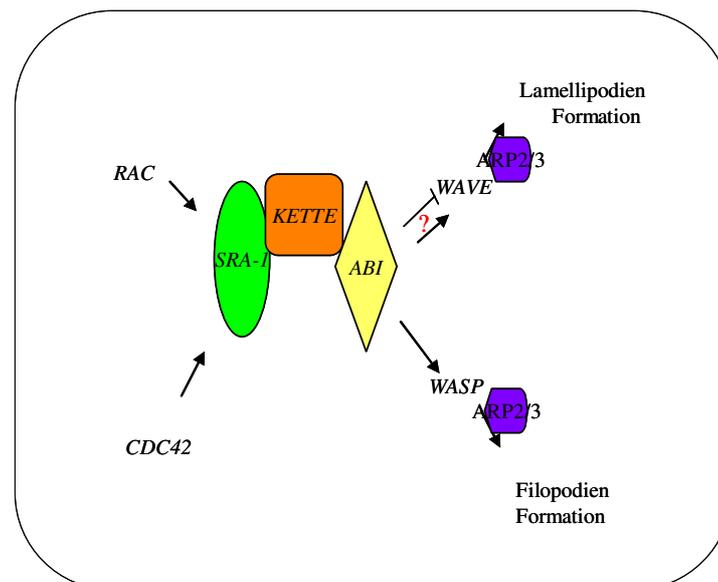


Abb. 6: Modell der AKTIN-Zytoskelettorganisation unter Einbeziehung des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes, den kleinen GTPasen CDC42 und RAC, sowie ARP2/3.

Die Stabilität des Komplexes, die von den einzelnen Mitgliedern abhängt, ist ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Regulation von WAVE nimmt. RNAi-Studien an *Drosophila* S2-Zellen haben gezeigt, dass der Verlust von ABI, KETTE oder SRA-1 zu einer Reduktion des WAVE-Niveaus führt, die auf eine Proteasom-abhängige Degradation des ARP2/3-Aktivators zurückzuführen ist (Kunda *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2003). Weitere Daten belegen die Degradation aller Komplexkomponenten im Fall der

Ablation der Expression eines Komplexmitglieds durch RNAi (Bogdan *et al.*, 2004). Damit stehen Modelle für die Aktivierung und Deaktivierung von WAVE zur Verfügung, wobei unklar bleibt, wie die korrekte Lokalisation des aktiven WAVE-Proteins an der Membran sichergestellt wird. Ein aussichtsreicher Kandidat ist das SH2-SH3-Adapter-Protein NCK, das genau wie sein *Drosophila*-Homolog DREADLOCKS (DOCK) bereits durch genetische und biochemische Analysen mit verschiedenen Komplexmitgliedern in Zusammenhang gebracht werden konnte.

Genetische Untersuchungen an membranassoziierten Formen der Proteine KETTE, ABI und SRA-1 haben ergeben, dass alle Proteine ihre Funktion an der Membran ausüben. In Überexpressionsstudien konnten Effekte auf die Anzahl und Morphologie der mechanosensorischen Borsten im peripheren Nervensystem (PNS) von *Drosophila* beobachtet werden (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005). Während WAVE diesen Phänotyp nicht beeinflusst, führt eine Reduktion der Gendosis von WASP interessanterweise zu seiner Repression (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005). Die Regulation der Aktivität und Stabilität des WAVE-Proteins scheint somit zumindest in *Drosophila* nicht die einzige Aufgabe des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes zu sein. Vielmehr scheint der KETTE/ABI/SRA-1-Komplex auch für die Regulation der Aktivität von WASP Bedeutung zu haben (Abb. 6).

1.5 Die mechanosensorische Borste als Modell für AKTIN-Regulation während der Entwicklung

Als Teil des PNS von *Drosophila* sind die mechanosensorischen Borsten der adulten Fliege echte Sinnesorgane. Aufgrund ihrer Entwicklung lassen sich aus Morphologie und Anzahl der Borsten gleich in mehrfacher Hinsicht Rückschlüsse auf die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts ziehen. Zum einen spiegelt die Morphologie der adulten Borsten die AKTIN-Bildung während ihrer Entwicklung wieder, so dass Effekte auf das AKTIN-Zytoskelett direkt am Phänotyp der Borste analysiert werden können (Overton, 1967; Tilney *et al.*, 1996; Tilney *et al.*, 2000; Tilney *et al.*, 2004).

In einem Zeitraum zwischen 32 und 48 Stunden nach Beginn des Pupariums (*APF*-*after puparium formation*) entwickelt die Borstenzelle einen Fortsatz, der longitudinale

F-AKTIN-Bündel enthält, die durch Verschmelzung kleinerer Module bis zu 400 μm verlängert werden können (Hopmann und Miller, 2003; Jacinto und Baum, 2003). Diese Module entstehen an der Spitze der entwickelnden Borste (tip growth) und werden bis zur Verschmelzung verlängert (shaft elongation) (Tilney *et al.*, 1996, 2000; Fei *et al.*, 2002; Tilney *et al.*, 2003). Auf diese Weise erreichen die Borsten ihre charakteristische Länge.

Nach der Chitinierung des Fortsatzes werden die AKTIN-Bündel degradiert, der zelluläre Fortsatz zurückgebildet und die Borste bleibt als Hohlkörper bestehen (Hopmann und Miller, 2003). Die Regulation der AKTIN-Polymerisation ist daher in der adulten Borste sichtbar.

Zum anderen wird jede Borste, gleichgültig ob Makro- oder Mikrochaete, aus einer sogenannten *sensory organ precursor cell (SOP)* generiert, die nach drei asymmetrischen Zellteilungen die Zellen des kompletten Organs ausbildet. Auf diese Weise entstehen ein Neuron, eine Gliazelle, eine Schaftzelle, eine Sockelzelle und eine Hüllzelle (Abb. 7 B). Die Teilung in Tochterzellen mit unterschiedlichem Zellschicksal erfordert eine genau geregelte Verteilung von Zellschicksal-Determinanten in der *SOP*, die vermutlich Zytoskelett-abhängig erfolgt (Berdnik und Knoblich, 2002). Störungen des Verteilungsmusters können das Zellschicksal beeinflussen und resultieren daher häufig in sichtbar veränderter Borstenanzahl.

Kopf und Thorax von *Drosophila melanogaster* eignen sich zur Untersuchung dieser Prozesse, da die Makrochaeten an genau definierten, stereotypen Positionen entstehen, die zwischen verschiedenen Individuen nicht differieren (Abb. 7 A). Zudem werden in *Drosophila* die adulten Gewebe während der Metamorphose aus sogenannten Imaginalscheiben gebildet, die bereits in der Larve vorhanden sind und untersucht werden können. Einige Spezifizierungsprozesse finden schon in larvalen Stadien statt. Die Anzahl der *SOPs*, aus denen die thorakalen Makrochaeten gebildet werden, steht im dritten Larvenstadium fest und kann anhand von Antikörperfärbungen analysiert werden.

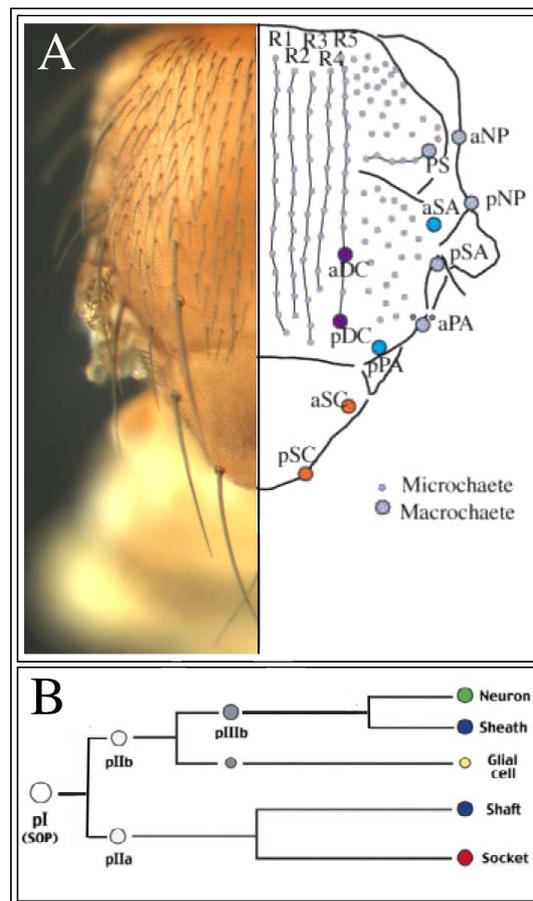


Abb. 7: Darstellung der unveränderlichen Positionen der Makrochaeten auf dem Thorax (A) und der SOP-Zelllinie (B).

Erläuterungen siehe Text. Teile des Bildes A sind entnommen aus und B modifiziert nach Ben-Yaacov, 2001. Abbildung A ist eine Projektion. NP: Notopleuralborsten; DC: Dorsocentralborsten; SC: Scutellarborsten; SA: Supra-Alarborsten; PA: Post-Alarborsten; PS: Presuteralborsten

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit bestand zum einen in der genaueren Charakterisierung des Gens *cabrio/mummy*, dessen Zugehörigkeit zu einer Transkriptionseinheit im *Drosophila melanogaster*-Genom geklärt werden sollte. Eine anschließende funktionelle Analyse, die Aufschluss über die Korrelation der beobachteten Phänotypen geben sollte, war beabsichtigt.

Der andere Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen zur Genfunktion des *Drosophila-Nap1*-homologs *kette* in adulten Geweben sowie der Identifizierung und Analyse potentieller Interaktionspartner von KETTE auf genetischer Basis. Dabei waren Proteine von besonderem Interesse, die mit der Regulation AKTIN-abhängiger Prozesse in Verbindung gebracht werden können, da Hinweise auf eine Beteiligung von KETTE in diesen Prozessen vorlagen. Das in anderem Zusammenhang bereits als Interaktionspartner identifizierte Protein DREADLOCKS (DOCK) sollte durch Überexpressionsstudien membranassoziierter Proteinformen auf seine Rolle bei der AKTIN-Regulation untersucht werden. Das übergeordnete Ziel dieser Untersuchungen war die Charakterisierung AKTIN-regulierender Mechanismen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern 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)	GIBCO/BRL (Eggenstein)
La Roche (Mannheim)	Merck (Darmstadt)	Pharmacia/LKB (Freiburg)
Roth (Karlsruhe)	Serva (Heidelberg)	Sigma (Deisenhofen)

Alle Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18 g Agar in 500 ml H ₂ O lösen und autoklavieren 150 ml H ₂ O zugeben und aufkochen 3 ml Eisessig zugeben und Platten gießen
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O ü.N. lösen und autoklavieren

<i>Drosophila</i> -Standardmedium (pro Liter Leitungswasser)	8,5 g Agar und 77 g Maismehl (in 1 l H ₂ O) aufkochen 18 g Trockenhefe und 10 g Sojamehl hinzugeben 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup hinzugeben auf eine Temperatur von 60 °C abkühlen lassen 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Eßlöffel Nipagin hinzugeben nach dem Abkühlen einen Tropfen Frischhefe aufsetzen
Gelladungspuffer (10x)	4 M Harnstoff 50 % Saccharose 50 mM EDTA Spatelspitze Xylencyanol Spatelspitze Bromphenolblau
Hoyer's Medium	50 ml H ₂ O und 30 g <i>Gummi arabicum</i> ü. N. rühren 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben und verrühren
Hybridisierlösung	100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA zum Hybridisierungspuffer geben
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid 5 x SSC 0,1 % Tween 20
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA 1,5 µg Helper-DNA 1 µl Lebensmittelfarbe 1,5 µl 10 x Injektionspuffer

Injektionspuffer (10x)	ad 15 µl H ₂ O 1 mM PO ₄ -Puffer (pH 7,4) 50 mM KCl
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extract 10 g NaCl ad 1 l H ₂ O (pH 7 einstellen und autoklavieren) für LB-Agarplatten 24 g Agar / l Medium
Lysispuffer	100 mM EDTA 100 mM Tris-HCl (pH 9,0) 1 % SDS
Lysispuffer für Embryonenlysate (<i>Western Blot</i>)	50 mM Tris-Cl (pH 7,5) 150 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 0,25 M Sucrose 0,1 mM DTT 1 mM PMSF
Mowiol-Lösung	12 g Mowiol in 30 g Glycerin lösen (intensiv mind. 2 h rühren und dabei leicht erwärmen) 30 ml ddH ₂ O zugeben und 5 min rühren 60 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) zugeben 10 min bei 56 °C rühren Bei 5000 g 15 min zentrifugieren Überstand portionieren und bei -20 °C aufbewahren

Natriumhypochloridlösung	10 - 15 % aktives Chlor (NaOCl) (Chlorbleichlauge, Schindler & Co.) 1:1 mit Leitungswasser verdünnen
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-HCl, (pH 9,5)
Neomycin- Futtermedium	<i>Drosophila</i> -Standardmedium schmelzen, der FRT-Insertion entsprechende Menge Neomycin-Lösung (für das FRT40A 150 µl) einrühren und erkalten lassen
Neomycin (G418)-Lösung	25 mg/ml G418 in PBS lösen mit Lebensmittelfarbe oder Bromphenolblau anfärben
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl pH 7,6
PBT	0,3 % Triton X-100 in PBS
PBT für Phalloidinfärbungen	0,1 % Triton X-100 in PBS

Phosphat-Puffer, 1 M (pH 7,2)	68,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 31,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄
Phosphat-Puffer, 1 M (pH 7,4)	77,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄
Puffer A	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCL (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15 % Isopropanol 0,15 % Triton X-100
QC	1 M NaCl 50 mM MOPS pH 7,0 15 % Isopropanol
QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris, Tris-HCl pH 8,5 15 % Isopropanol

RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem ddH ₂ O
SB-Medium	35 g Trypton 20 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O pH 7,5 mit 10 N NaOH einstellen und autoklavieren
SDS (10%)	10 % Natriumdodecylsulfat-Lösung
SDS-Page	
SDS-Probenpuffer (2x)	0,125 M Tris-Cl 4 % SDS 20 % Glycerol 0,02 % Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol auf pH 6,8 einstellen
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
Sammelgel 4 % (10 ml)	1,33 ml Acrylamidlösung 2,5 ml Sammelgelpuffer (4x) 0,1 ml SDS 10 % 6 ml H ₂ O 100 µl APS (10 %) 10 µl TEMED
Trenngel 10 % (30 ml)	10 ml Acrylamidlösung 7,5 ml Trenngelpuffer (4x) 0,3 ml SDS 10 %

	12,1 ml H ₂ O
	300 µl APS (10 %)
	20 µl TEMED
Elektrodenpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
	auf pH 8,3 einstellen
SOC-Medium	2 % Bacto Trypton
	0,5 % Bacto Yeast Extract
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	autoklavieren, danach auf
	20 mM Glucose einstellen
SquiB	10 mM Tris pH 8,2
	1 mM EDTA
	25 mM NaCl
	unmittelbar vor der Verwendung auf 200 µg/ml
	Proteinase K einstellen
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	89 mM Tris-HCl, pH 8,2 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBS/Tween 20	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 137 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 % Methanol auf pH 8,2-8,4 einstellen
Tris-HCl	1 M Trisbase Mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen
X-Gal-Färbelösung	10 mM PO ₄ (pH 7,2) 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 3 mM K ₄ [FeII(CN) ₆] 3 mM K ₃ [FeIII(CN) ₆] 3 % Triton X-100
X-Gal-Lösung	10 % X-Gal in DMSO

2.1.3 Verwendete Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Referenz/ Herkunft
BP102	Maus, monoklonal	1:50-1:100	Patel & Goodman, unveröffentlicht
1D4 (anti-FASCICLINII)	Maus, monoklonal	1:10	Helt & Goodman, unveröffentlicht
anti-DISCS-LARGE	Maus	1:100	Developmental Studies, Hybridoma Bank; Iowa
anti-ELAV	Ratte, monoklonal	1:10	Rubin, unveröffentlicht
22C10 (anti-FUTSCH)	Maus, monoklonal	1:50-1:100	Fujita <i>et al.</i> , 1982
Anti-HRP-FITC	Ziege	1:100	Dianova GmbH
9E10 (anti-MYC)	Maus, monoklonal	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
2D5 (anti-FAS III)	Maus, monoklonal	1:10	Patel <i>et al.</i> , 1987
(1G9) anti-HINDSIGHT	Maus, monoklonal	1:10-1:20	Developmental Studies, Hybridoma Bank, Iowa
anti-GFP	Kaninchen	1:500	Böckers, unveröffentlicht
anti-KETTE	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Bogdan und Klämbt, 2003

anti-DOCK	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Muda, 2002
nc46	Maus	1:10	Hofbauer, 1991
anti- β -GALAKTOSIDASE	Kaninchen, polyklonal	1:10	Cappel

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

2.1.3.2.1 Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Herkunft
Ziege anti-Maus	HRP-gekoppelt	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	AP-gekoppelt	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	HRP-gekoppelt	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	AP- gekoppelt	1:1000	Linaris
Anti-Digoxigenin	AP-gekoppelt	1:2000	Roche

2.1.3.2.2 Fluoreszenz-Antikörper

Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Herkunft
Ziege anti-Maus	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	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, 647	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa 488, 568, 647	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Alexa 488, 568, 647	1:1000	Molecular Probes

2.1.4 Fliegenstämme

Die im Folgenden aufgelisteten Stämme wurden während dieser Arbeit hauptsächlich verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit generierte Stämme und Transgene sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.1.4.1 Wildtypstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>wt</i> ^{oregonR}	Wildtyp	Lindsley & Zimm, 1992
<i>w</i> ¹¹¹⁸	<i>white</i>	Lindsley & Zimm, 1992

2.1.4.2 Zweitchromosomale Mutationen

Mutation	Allel	Referenz
<i>mummy (mmy)</i>	<i>G1-31</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>mummy (mmy)</i>	<i>H1-20</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>mummy (mmy)</i>	<i>J1-201</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>mummy (mmy)</i>	<i>Q1-80</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>mummy (mmy)</i>	<i>Z234</i>	Nüsslein-Volhard <i>et al.</i> , 1984
<i>mummy (mmy)</i>	<i>Z237</i>	Nüsslein-Volhard <i>et al.</i> , 1984
<i>kübel</i>	<i>Q092</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kübel</i>	<i>M409</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kübel</i>	<i>SO93</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kübel</i>	<i>G114</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999

2.1.4.3 Drittachromosomale Mutationen

Mutation	Allel	Referenz
<i>kette</i>	<i>J4-48</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kette</i>	<i>G1-37</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kette</i>	<i>P168</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kette</i>	<i>C3-20</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kette</i>	<i>J1-70</i>	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kette</i>	$\Delta 14-2$	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>kette</i>	$\Delta 2-6$	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>wasp</i>	<i>1</i>	Ben-Yaacov <i>et al.</i> , 2001
<i>wasp</i>	<i>3</i>	Ben-Yaacov <i>et al.</i> , 2001

2.1.4.4 Multimarkerchromosomen

Marker	Chromosom	Balancer
<i>al¹ dp¹ pr¹ cn¹ c¹ px¹ sp¹</i>	2tes Chromosom	CyO
<i>al¹ dp¹ pr¹ Bl¹ c¹ px¹ sp¹</i>	2tes Chromosom	CyO
<i>ru¹ h¹ th¹ st¹ cu¹ pnr¹ sr¹ e^s ca¹</i>	3tes Chromosom	TM3 _{Sb1Ser1}
<i>ru¹ h¹ th¹ st¹ cu¹ sr¹ e^s Pr¹ ca¹</i>	3tes Chromosom	TM6B

2.1.4.5 P-Element-Insertionslinien

Alle Linien, soweit nicht anders aufgeführt, wurden aus dem „Bloomington Stock Center“, Bloomington, Indiana, USA, bezogen. Die unten in der Tabelle aufgeführte genetische Konstitution der Fliegenstämme ist gemäß den Angaben der *Flybase* dargestellt.

BL-Stocknr.	P-Element-Insertion	Chromosom	Lokalisation
10954	<i>l(2)k09923</i>	2tes Chromosom	26D1-2
	<i>l(2)k03851</i>	2tes Chromosom	26D1-2/53C1-2
10673	<i>l(2)k07502b</i>	2tes Chromosom	026D01-02
10527	<i>l(2)k03201</i>	2tes Chromosom	026D06-09
11121	<i>l(2)k14206</i>	2tes Chromosom	026F03-05
11102	<i>l(2)k13720</i>	2tes Chromosom	026C02-03
10480	<i>l(2)k00605</i>	2tes Chromosom	027A01-02
10560	<i>l(2)k04917</i>	2tes Chromosom	026D06-08
12308	<i>l(2)k06107</i>	2tes Chromosom	026D1-2
	<i>l(2)k13811</i>	2tes Chromosom	032C1-4
13741	<i>DLP[KG01694]</i>	2tes Chromosom	026D6
10560	<i>Sec61alpha[k04917]</i>	2tes Chromosom	026D06-08
11121	<i>l(2)k14206</i>	2tes Chromosom	026F03-05
15133	<i>CG9535[KG08617]</i>	2tes Chromosom	026D05
13805	<i>CG9535[KG04349]</i>	2tes Chromosom	026D05
14661	<i>KG07822</i>	2tes Chromosom	026D04
11584	$P\{ry^{+17.2}=PZ\}Hem^{03335}$ <i>ry</i> ⁵⁰⁶	3tes Chromosom	079E01-02
11537	<i>RpLP0[01544]</i>	3tes Chromosom	079D01-02

2.1.4.6 EP-Linien

Linie	Chromosom	Referenz
<i>EP 0388</i>	2tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 1228</i>	2tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 2016</i>	2tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 2027</i>	2tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 2108</i>	2tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 2180</i>	2tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 3267</i>	3tes Chromosom	Szeged Stock Center
<i>EP 0789</i>	3tes Chromosom	Szeged Stock Center

2.1.4.7 Gal4-Aktivatorlinien

Stamm	Expressionsmuster/ Promotor	Chromosom	Referenz/ Herkunft
<i>elavGal4</i>	<i>elav</i>	X Chromosom	Lin & Goodman, 1994
<i>scaGal4</i>	<i>scabrous</i>	2tes.Chromosom	Hinz <i>et al.</i> , 1994
GMRGal4	<i>glass</i> Multimer Reporter	2tes Chromosom	Ellis <i>et al.</i> , 1993
<i>eyGal4</i>	<i>eyeless</i>	2tes Chromosom	Bloomington
<i>enGal4</i>	<i>engrailed</i>	2tes Chromosom	Bloomington
<i>armGal4</i>	<i>armadillo</i>	2tes Chromosom	Bloomington
<i>elavGal4</i>	<i>elav</i>	2tes Chromosom	Lin & Goodman, 1994
<i>dppGal4</i>	<i>decapentaplegic</i>	3tes Chromosom	Bloomington
<i>daGal4</i>	<i>daughterless</i>	3tes Chromosom	Wodarz <i>et al.</i> , 1995
<i>pnrGal4</i>	<i>pannier</i>	3tes Chromosom	Calleja <i>et al.</i> , 1996

2.1.4.8 UAS Effektorlinien

Stamm	Beschreibung/Gen	Lokalisation	Referenz/ Herkunft
UAS <i>Abi</i> ^{RNAi-1}	<i>Abelson Interactor</i>	3tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> ^{RNAi-2}	<i>Abelson Interactor</i>	2tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> ^{RNAi-5}	<i>Abelson Interactor</i>	2tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Sra-1</i> ^{RNAi-1}	specifically rac associated Protein 1	3tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> -1	<i>Abelson Interactor</i>	3tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> -2	<i>Abelson Interactor</i>	3tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> ^{myr-2}	<i>Abelson Interactor</i> , membranverankert	3tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> ^{myr-2.7}	<i>Abelson Interactor</i> , membranverankert	3tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>Abi</i> ^{myr-2.5}	<i>Abelson Interactor</i> , membranverankert	2tes Chromosom	Bogdan, unveröffentlicht
UAS <i>act5cGFP</i>	<i>Actin5c-GFP</i> - Fusionsprotein	2tes Chromosom	Wolf <i>et al.</i> , 2002
UAS <i>hem</i> 1 V (T249)	<i>kette</i>	2tes Chromosom	Hummel
UAS <i>hem</i> 2 XI (T263)	<i>kette</i>	2tes Chromosom	Hummel
UAS <i>hem</i> 2 II (T262)	<i>kette</i>	2tes Chromosom	Hummel

2.1.4.9 Balancer- und Markerstämme

Angegeben sind alle Marker/Balancerstämme, die verwendet wurden, ausgenommen die nur im Defizienzenkit enthaltenen.

Balancer/Marker	Chromosom	Insertion	Referenz
CyO	2tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992
CyO ^{bb}	2tes Chromosom	P[ry, elav-lacZ]	Klämbt, unveröffentlicht
CyO ^{bb}	2tes Chromosom	P[ry, wg-lacZ]	Kidd, unveröffentlicht
In(2LR)Gla ^{wg^[Gla-1]} / CyO ^{GFP}	2tes Chromosom	CyO, P{w ^{+mC} GAL4- twi.G}2.2, P{UAS- 2xEGFP}AH2.2	Michelson, 2003
Sp	2tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992
Tft	2tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992
TM6 ^{bbTb}	3tes Chromosom	P[ry, Ubx-lacZ]	Vässin, unveröffentlicht
TM3 ^{Sb}	3tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992
w ⁻ ;CyO/Sp; TM2 ^{Ubx} /MKRS	2tes & 3tes Chromosom		Klämbt, unveröffentlicht
w ⁻ ;CyO ^{bb} /Sp; TM2 ^{Ubx} /TM6 ^{bbTb, Hu}	2tes & 3tes Chromosom	P[ry, elav-lacZ]/ [ry, Ubx-lacZ]	Klämbt, unveröffentlicht
TM2 ^{Ubx}	3tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992
w ⁻ ;TM3 ^{Sb} /TM6B ^{Tb, Hu}	3tes Chromosom		Klämbt, unveröffentlicht
SM6a ^{Cy}	2tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992
TM1 ^{Moi}	3tes Chromosom		Lindsley & Zimm, 1992

2.1.4.10 FRT/FLP-Stämme

Angegeben sind alle Stämme, die im Verlauf dieser Arbeit für Experimente nach der Methode der „klonalen Analyse“ (Golic, 1991; Xu und Rubin, 1993) verwendet wurden. Die Stämme wurden zum größten Teil aus dem „Bloomington Stock Center“, Bloomington, Indiana, USA bezogen. Die Methode ist in Abschnitt 2.2.1.9. beschrieben.

2.1.4.10.1 Zweitchromosomale FRT/FLP- Stämme

Bl-Stocknr.	Genotyp	Insertion
1816	$y^1 w^{118} P\{y^{+17.2} ry^{+17.2} = \text{Car20}\} 25F$ $P\{ry^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 40A$	025F; 040A
1818	$w^{118}; P\{w^{+mC} = \text{piM}\} 36F$ $P\{ry^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 40A$	036F; 040A
1821	$Tft^1 P\{ry^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 40A$	040A
1622	$P\{ry^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 40A$	040A
5622	$y^1 w^{118} P\{ry^{+17.2} = \text{ey-FLP.N}\} 2$ $P\{GMR-lacZ.C(38.1)\} \text{TPN1};$ $l(2)cl-L3^1 P\{w^{+t}\} 30C$ $P\{ry^{+17.2} = \text{neo FRT}\} 40A$	030C; 040A
	$mmy^{J1-201}. P\{ry^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 40A$	026D; 040A
	$w^-; dock P\{ry^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 40A$	021E2; 040A

2.1.4.10.2 Drittchromosomale FRT/FLP- Stämme

Bl-Stocknr.	Genotyp	Lokalisation
	$eyFLP; P\{Ubi-GFP(S65T)nls\} 3L$ $P\{neoFRT\} 80B$	3L; 80B
5621	$y^{d2} w^{1118} P\{ry^{+17.2} = \text{ey-FLP.N}\} 2$ $P\{GMR-lacZ.C(38.1)\} \text{TPN1};$ $RpS17^4 P\{w^{+*} ry^{+*} = \text{white-}$ $unl\} 70C P\{r^{+17.2} = \text{neoFRT}\} 80B$	070C; 080B
1988	$w^*; P\{neoFRT\} 80B ry^{506}$	80B
1948	$y^1 w^{1118}; P\{\text{piM}\} 75C$ $P\{neoFRT\} 80B$	075C; 080B

Bl-Stocknr.	Genotyp	Lokalisation
6341	$P\{ry^{+7.2}=hsFLP\}22, y^1 w^*;$ $P\{w^{+mC}=arm-lacZ.V\}70C$ $P\{ry^{+7.2}=neoFRT\}80B$	070C; 080B
	$y^1 w^{1118} hsFLP; CyO/Sp; P\{Ubi-$ $GFP(S65T)nls\}3L$ $P\{neoFRT\}80B$	3L; 080B
1459	$P\{neoFRT\}82B P\{piM\}87E$ $P\{piM\}97E$	082B; 087E; 097E
2045	$y^1 w^{1118} P\{neoFRT\}82B$ $P\{piM\}87E Sb^{63b} P\{Car20y\}96E$	082B; 087E; 096E
2050	$w^{1118}; P\{neoFRT\}82B P\{white-$ $un1\}90E$	082B; 090E
5188	$w^*; P\{neoFRT\}82B P\{Ubi-$ $GFP\}83$	082B; 083
6334	$w^*; P\{ry^{+7.2}=neoFRT\}82B pnr^{VX6}$	082B
1929	$P\{hsFLP\}12, y^1 w^*; noc^{Sco}/ CyO$	n. d.

2.1.4.11 Deletionsmutationen

In dieser Arbeit wurde das vollständige „Defizienzenkit“ des „Bloomington Stock Centers“, Bloomington, Indiana, USA, verwendet, wie es im Mai 2002 erhältlich war. Alle Stämme sind im Anhang IX unter Angabe der Stammnummern und der Bruchpunkte gemäß den Informationen des Stockcenters aufgeführt. Weitere verwendete Deletionsmutanten, die nicht Teil des „Defizienzenkits“ waren, werden im Folgenden beschrieben.

2.1.4.11.1 X-Chromosomale Deletionsmutanten

Bl-Stocknr.	Defizienz	Bruchpunkte	Balancer
5273	Df(1)19	013F02-18; 014E	$C(1)DX, y^{[1]} w^{[1]} f^{[1]};$ $Dp(1;4)r^+$
3658	Df(1)sd72a	013F; 014A	FM7a

2.1.4.11.2 Zweitchromosomale Deletionsmutanten

Bl-Stocknr.	Defizienz	Bruchpunkte	Balancer
6697	<i>Df(2L)S2</i>	021C06-D01; 022A06-B01	CyO
1581	<i>Df(2L)JS31</i>	023A03-04; 023D	CyO
3910	<i>Df(2L)N6</i>	023A06; 023B01	CyO
702	<i>Df(2L)ed-dp</i>	024C03-05; 025A02-03	SM1
3814	<i>Df(2L)sc19-7</i>	024D02-04; 025C02-03	In(2L)Cy ^L t ^R
6224	<i>Df(2L)cl2</i>	025D02-04; 025F02-04	CyO
3365	<i>Df(2L)cl7</i>	025E01-02; 026A07	CyO
490	<i>In(1)w[m4];Df(2L)E110</i>	025F03-26A01; 026D03-11	CyO
6114	<i>Df(2L)AP1</i>	026A; 026B05-06	SM1
7502	<i>Df(2L)Exel6016</i>	26C1; 26D1	CyO
7800	<i>Df(2L)Exel9038</i>	26C2; 26C3	CyO
	<i>Df(2L) tigrin X</i>	n. d.	CyO
7801	<i>Df(2L)Exel7027</i>	26F5; 27B1	CyO
6454	<i>Df(2L)BSC9</i>	v 026F05-07; 027A02-B02	SM6a
3571	<i>Df(2L)Dwee-delta5</i>	027A; 028A	CyO
2977	<i>Df(2L)wg-CX3</i>	027F01-03; 028A	CyO
3131	<i>Df(2L)esc-P3-0</i>	033A01-02; 033E	Cy ¹ amos ^{Roi-1}
3129	<i>Df(2L)esc10</i>	033A08-B01; 033B02-03	CyO
3782	<i>Df(2L)TW9</i>	037E02-F01; 038B01-C01	CyO
1602	<i>Df(2L)TW65</i>	037F05-38A01; 039E02-F01	CyO

BL-Stocknr.	Defizienz	Bruchpunkte	Balancer
5423	<i>Df(2R)Np4</i>	044F11; 045C01	CyO
6359	<i>Df(2;3)vg89e88</i>	052B03-C01; 053E02-F01	In(2L)Cy
6778	<i>Df(2R)02B10W-08</i>	054E08; 054F03-04	SM6a
5426	<i>Df(2R)RM2-1</i>	054F02; 056A01	CyO
6647	<i>Df(2R)BSC22</i>	056D07-E03; 056F09-12	SM6a
5847	<i>Df(2R)D4</i>	057A01-03; 057B13	CyO
3469	<i>Df(2R)PK1</i>	057C05; 057F05-06	SM1
5764	<i>Df(2R)XE-2900</i>	057F02; 058A01	CyO

2.1.4.11.3 Drittrchromosomale Deletionsmutanten

BL - Stocknr.	Defizienz	Bruchpunkte	Balancer
4502	<i>Df(3L)RM5-2</i>	065E01-12; 066B01-02	TM6B ^{Tb1}
3641	<i>Df(3L)th102</i>	071F03-05; 072D12	TM6C ^{cul Sbl cal}
3201	<i>Df(3L)st-g24</i>	072D01-02; 073A09-10	TM6B ^{Tb1}
197	<i>Df(3L)st-b11</i>	072D10-11; 073D01-02	TM6B ^{Tb1}
5916	<i>Df(3R)T-61</i>	086E03; 087A09	TM6B ^{Tb1}
6165	<i>Df(3R)kar-H5</i>	087A01-02; 087D05-07	TM6
3808	<i>Df(3R)ry75</i>	087D02; 087D14-E01	TM3 ^{Sbl}
1726	<i>Df(3R)Cbx^{TwtL}Ubx^{KM5R}</i>	087E-F; 088B	TM1
1917	<i>Df(3R)red31</i>	087F12-14; 088C01-03	TM6B ^{Tb1}
756	<i>Df(3R)sbd105</i>	088F09-89A01; 089B09-10	TM3 ^{Ser1}
1425	<i>Df(3R)M37</i>	098D03-07; 098D03-07	TM3 ^{Sbl}

2.1.5 Verwendete Vektoren

pOT2

pGEM-T (Promega)

pWIZ (Lee and Carthew, 2003)

2.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.1.7 Verwendete cDNA-Klone

Die untersuchten Klone wurden vom DGRC (*Drosophila Research Genome Center*) bezogen.

cDNA-Klon	vorhergesagtes Gen	Vektor	Antibiotikaresistenz
SD 04586	CG 9531	pOT2a	Chloramphenicol, 12,5 µg/ml
LD 44264	CG 9535	pOT2a	Chloramphenicol, 12,5 µg/ml
LD 47671	CG 9536	pOT2a	Chloramphenicol, 12,5 µg/ml

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte, soweit nicht anders verzeichnet, auf Futtermedium in Standard-Plastiktöpfen auf 25 °C oder Raumtemperatur. Für die Kreuzungsexperimente wurden ausschließlich jungfräuliche Weibchen (bis zu 10 h nach dem Schlüpfen bei 18 °C) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.1.2 Sammeln von Embryonen

Um Embryonen für *in-situ*-Hybridisierungen und Antikörperfärbungen zu gewinnen, wurden die Fliegen zur Eiablage in mit Luftlöchern versehene Plastiktöpfchen überführt, die mit einer kleinen Apfelsaftagarplatte verschlossen wurden, auf die zuvor ein wenig frische Bäckerhefe gegeben wurde. Die Apfelsaftagarplatten wurden alle 6-12 h gewechselt und bis zur Fixierung der Embryonen maximal 2 Tage bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.3 Komplementationsanalysen

Zur Bestimmung der allelischen Beziehungen der einzelnen Mutationen wurde mit Hilfe von Kreuzungsexperimenten die Komplementation untersucht. Als allelisch werden Mutationen bezeichnet, die sich gegenseitig nicht komplementieren.

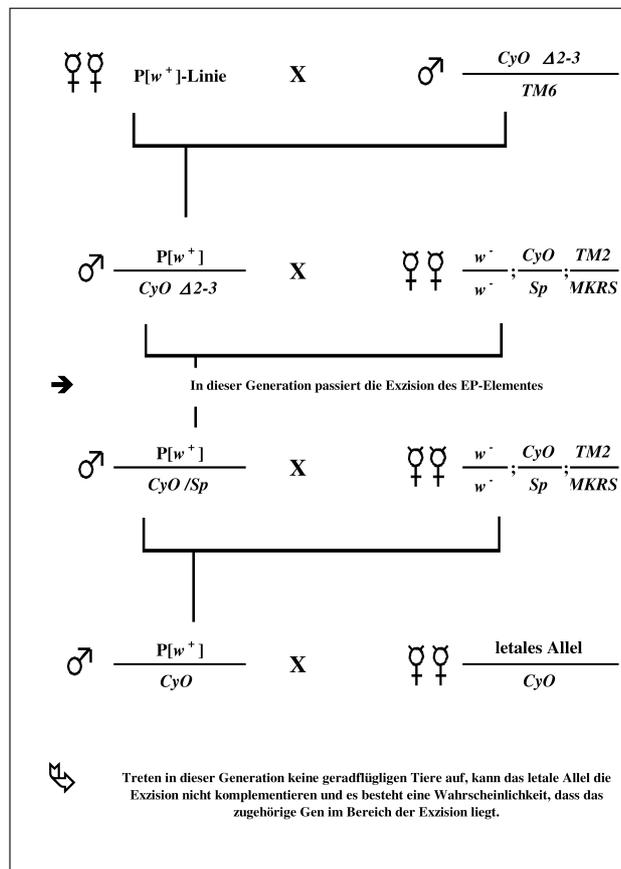
2.2.1.4 Herstellung von Rekombinanten

Zur Herstellung von Rekombinanten wurden genetische Standard-Methoden verwendet (Ashburner, 1989).

2.2.1.5 Δ -3 Transposonexzisionsmutagenese

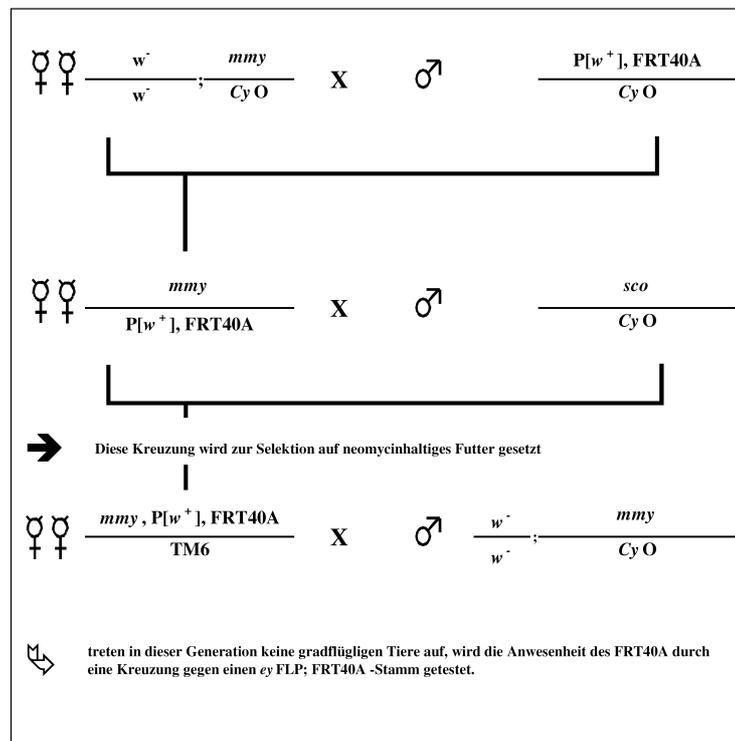
Durch Einkreuzen einer konstitutiv aktiven Transposase können Transposons mobilisiert werden. Bei dieser Reversion der P-Element-Insertion kommt es mit variabler Häufigkeit durch unpräzise Exzision des Transposons zu Deletionen in den an

das P-Element angrenzenden Regionen (Daniels *et al.*, 1985). Auf diese Weise können Gene, die in der Nähe der Transposons liegen, mutagenisiert werden. In dieser Arbeit wurden solche Exzisionsmutagenesen an folgenden P-Element-Insertionslinien durchgeführt: EP(3) 3267 und DLP[KG01694]. Zur Mobilisierung der Transposons wurde das $\Delta 2-3$ CyO Chromosom verwendet. Die transheterozygoten Männchen wurden dann gegen $w^-/w^-; CyO / Sp TM2/ MKRS$ Weibchen ausgekreuzt. In der F2-Generation konnte anhand der Augenfarbe auf das Ereignis selektioniert werden. Die betreffenden Fliegen zeigten den *white*-Phänotyp. Der Versuch wurde in Einzelkreuzungen angesetzt, um die Isolierung klonal verwandter Mutationen zu vermeiden. Die isolierten Mutationen wurden zur Etablierung der Stämme erneut gegen $w^-/w^-; CyO / Sp TM2/ MKRS$ Weibchen ausgekreuzt und dann zur Selektionierung auf Letalität gegen ein letales Allel gekreuzt. Das nachfolgende Kreuzungsschema verdeutlicht das Vorgehen bei der Exzisionsmutagenese am Beispiel einer zweitchromosomalen P-Insertion.



2.2.1.6 Klonale Analyse

Da Mutationen in entwicklungsbiologisch relevanten Genen in Homozygose in den meisten Fällen embryonal letal sind, kann die Genfunktion in späteren Entwicklungsstadien und dem adulten Tier nicht untersucht werden. Um solche Untersuchungen zu ermöglichen, bedient man sich deshalb der klonalen Analyse. Mit Hilfe des FLP/FRT-Systems, eines Rekombinationssystems aus der Hefe, wird in hoher Frequenz mitotische Rekombination induziert, was zu homozygot mutanten und homozygot wildtypischen Bereichen im ansonsten heterozygot mutanten Tier führt (Golic, 1991; Xu und Rubin, 1993). Dieses System wurde zur Untersuchung der *mummy*- und *kette*-Funktion im Auge verwendet. Die Rekombinationsereignisse wurden im Embryonalstadium 15 mit Hilfe des *eyeless*-Promotors oder im Larvenstadium 1 durch *heatshocks* induziert, um einen großen Klon zu erzeugen. Um mit diesem System zu arbeiten ist es notwendig einen Fliegenstamm herzustellen, der auf dem *mummy*- bzw. *kette*- Chromosom auch eine FRT-Sequenz am Centromer trägt. Folgendes Kreuzungsschema verdeutlicht das Vorgehen bei der klonalen Analyse am Beispiel von *mummy*.



Die zweite Kreuzung wird zur Selektion auf Neomycin-haltiges Futter gesetzt (G418) und mehrmals umgesetzt. Die daraus resultierenden Rekombinanten wurden gegen *white*⁻-Doppelbalancer etabliert und gegen ein anderes *mummy*-Allel auf Letalität getestet. Die Generierung von Klonen wurde entsprechend dem letzten Teil des Kreuzungsschemas durchgeführt. Für die Induktion im Auge wurde ein *eyeless*-FLP-Konstrukt verwendet (Newsome *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde ein *dpp*-lacZ-Konstrukt eingekreuzt, um die Auswirkungen des Gens *mummy* auf die Expression von *dpp* untersuchen zu können.

Zur Erzeugung des *kette*-FRT-Chromosoms wurde die unter 2.2.1.8. beschriebene „male recombination“ verwendet. Die Herstellung der Klone entsprach aber im Wesentlichen dem oben gezeigten Schema. Neben *eyeless*-FLP wurde zur Analyse von *kette* auch eine *heatshock*-Flipase genutzt, um die Klongröße zu variieren. Die durch den im ersten oder zweiten Larvalstadium gegebenen Hitzeschock (37 °C für 1 h) erhaltenen Klone sind im Vergleich mit den *eyeless*-FLP induzierten Klonen deutlich kleiner. Eine weitere angewandte Variationsmöglichkeit der Klongröße besteht in der Verwendung von Mutationen, die dem entstehenden Zwillingsklon einen Wachstumsnachteil verschaffen, wie z. B. *cell lethal* und *Minute*. Die entsprechenden FRT-Stämme sind im „Bloomington Stock Center“, Bloomington, Indiana, USA, erhältlich.

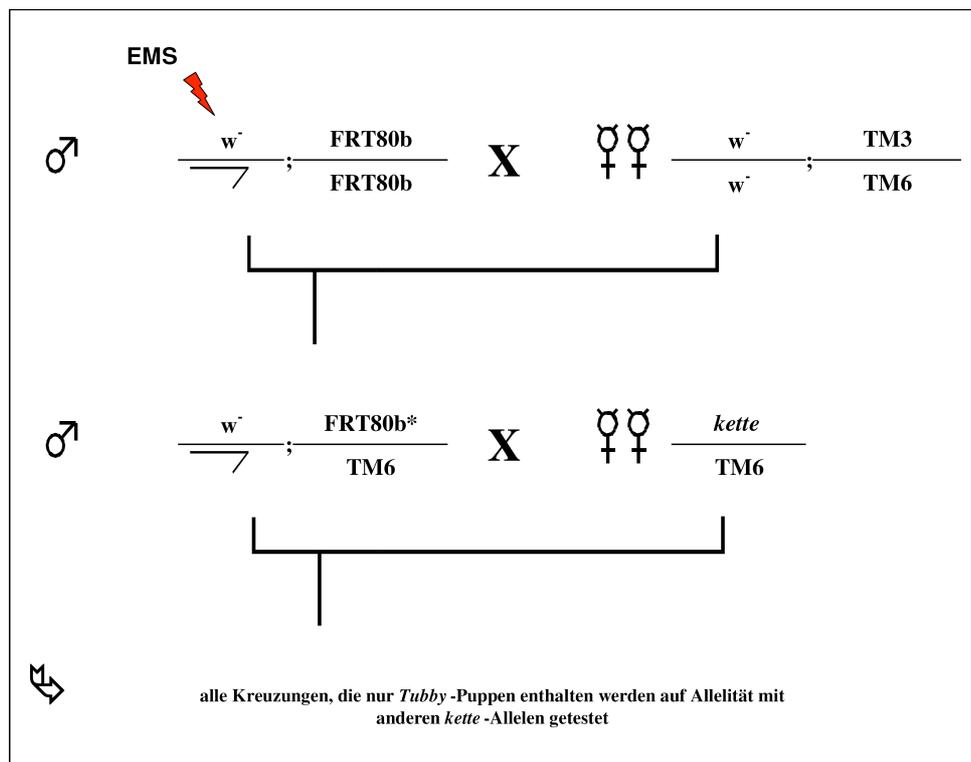
2.2.1.6.1 Herstellung des neomycinhaltigen Futters

Zur Herstellung des neomycinhaltigen Fliegenfutters wurden 150 µl einer 25 mg/ml G418-Lösung auf 10 ml Futter gegeben, das nach dem Kochen und Abkühlen mit kleinen Löchern zur besseren Durchmischung versehen oder in der Mikrowelle erneut geschmolzen worden war.

2.2.1.7 EMS-Mutagenese zur Generierung eines *kette*-FRT-Chromosoms

Da wegen der räumlichen Nähe des *kette*-Gens zur FRT-Insertion ein Rekombinationsereignis unwahrscheinlich war, wurde eine EMS-Mutagenese zur Erzeugung eines *kette*-FRT-Chromosoms durchgeführt. Pro Ansatz wurden ca. 50 3-4

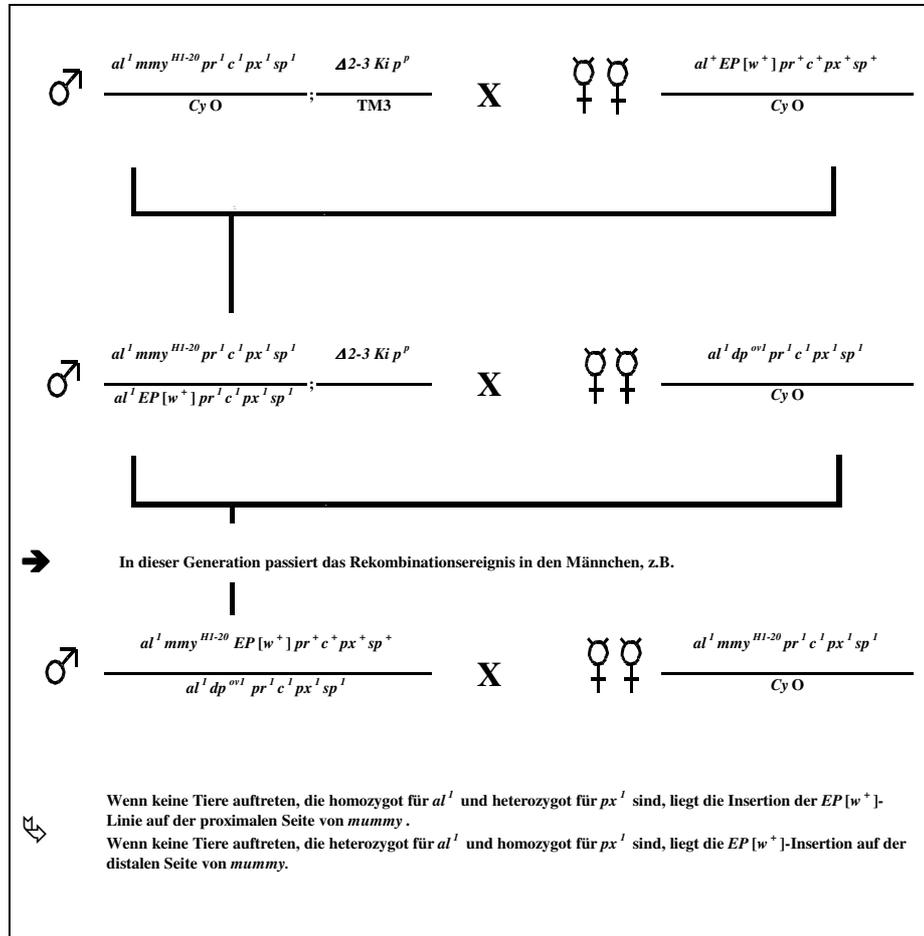
Tage alte, isogenisierte Männchen des Genotyps FRT80B/FRT80B nach 18-stündigem Hungern nach der Methode von Lewis und Bacher (1968) mit einer 25 mM EMS (Ethylmethansulfonat)-Lösung behandelt und dann gegen ca. 150 Weibchen des Genotyps w^+ ;TM3/TM6 gekreuzt. Von der F1-Generation wurden nur die Männchen weiterverwendet, die das TM6-Balancerchromosom trugen, da diese aufgrund des *Tb*-Markers eine Selektion der Puppen und damit eine schnellere Sichtung ermöglichen. Die TM6-Männchen wurden dann in Einzelzuchten gegen die Weibchen eines *kette*-Allels gekreuzt. In der F2-Generation konnten aufgrund des *Tb*-Markers bereits die Einzelzuchten gescreent werden, in denen die ersten Puppen geschlüpft waren. Röhren, die keine wildtypisch geformten Puppen enthielten, oder in denen die Fliegen aus diesen Puppen nicht schlüpften, wurden zur weiteren Charakterisierung als potentielle *kette*-FRT-Kandidaten behalten. Die Vorgehensweise ist im folgenden Kreuzungsschema dargestellt.



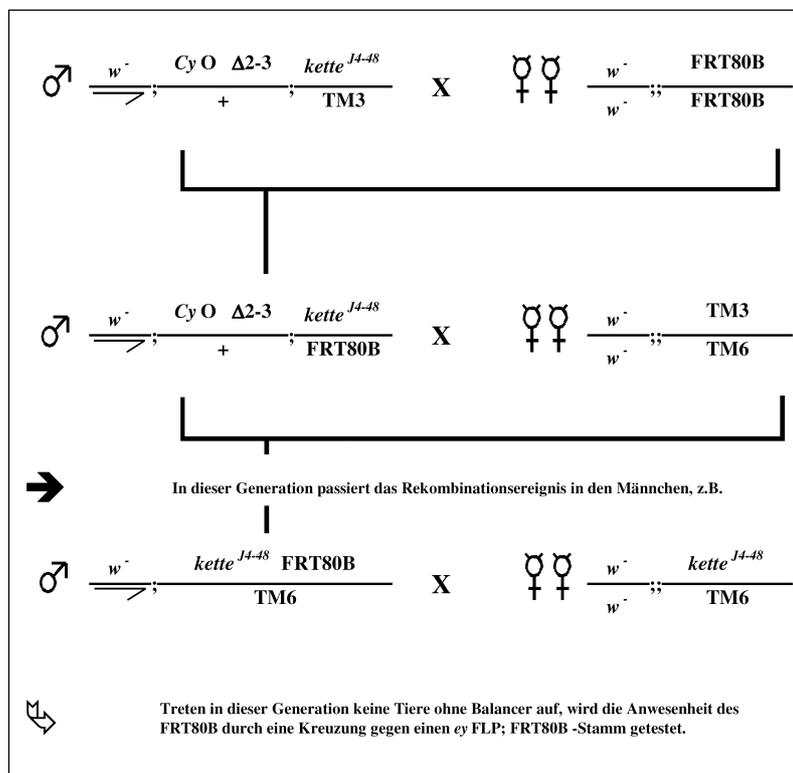
2.2.1.8 „male recombination“

Eine Methode, die Lokalisation eines Gens innerhalb einer Region genauer zu bestimmen, macht sich die P-Element-induzierte Rekombination in Männchen zunutze. Während bei den *Drosophila*-Männchen die Rekombination normalerweise vernachlässigbar ist, steigert sich die Rekombinationsrate auf bis zu 1 %, wenn das Tier ein P-Element und eine Transposasequelle trägt (Preston & Engels, 1996). Die Mehrheit der Rekombinationsereignisse entsteht dabei in einer Region von 4 kb, die das P-Element beinhaltet. Basierend auf dieser Tatsache wurden zwei Versuche zur Bestimmung der Lage des Gens *mummy* durchgeführt. In der durch die meiotische Kartierung eingegrenzten Region wurden mehrere P- bzw. EP-Element-Insertionslinien für die „male recombination“ verwendet. Es wurden P-Element-induzierte Rekombinanten isoliert, deren Trennung von proximal oder distal gelegenen Markern untersucht werden sollte (Chen *et al.*, 1998). Der Abstand der flankierenden Marker zu dem untersuchten Gen ist unwesentlich, was die Generierung der markierten Fliegenlinien wesentlich erleichtert. Im folgenden Kreuzungsschema ist der Versuchsablauf dokumentiert:

Die rekombinanten Tiere werden gegen markierte *mummy*-Allele zurückgekreuzt, wobei das Vorhandensein des *mummy*-Allels und eines Markers über die relative Position des Gens zu dem verwendeten P-Element Auskunft gibt.

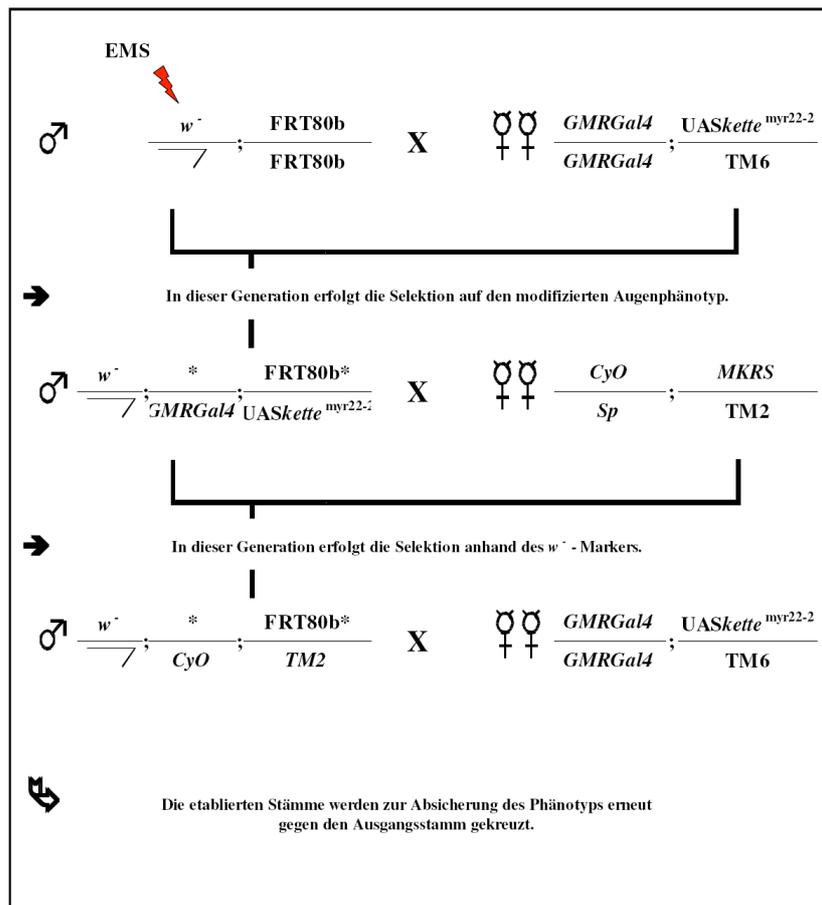


Die Methode der „male recombination“ wurde im Rahmen dieser Arbeit auch zur Erzeugung eines *kette* FRT Chromosoms verwendet. Da das Gen *kette* mit einer Lokalisation bei 79 E-F sehr nahe am Centromer liegt und sich die für eine klonale Analyse benötigte FRT-Sequenz (hier: FRT80B) zwischen dem zu untersuchenden Gen und dem Centromer befinden muss, war eine Herstellung des Chromosoms mit Hilfe genetischer Standard-Methoden (Ashburner, 1989) nicht erfolgversprechend. Bei der Verwendung der „male recombination“ wurde die Tatsache nutzbar gemacht, dass es sich bei einer FRT-Site um ein P-Element handelt, das wie oben beschrieben zur Rekombination herangezogen werden kann. Das nachfolgende Kreuzungsschema veranschaulicht die Vorgehensweise.



2.2.1.9 F1-Modifier-Mutagenese

Zur Bestimmung von *kette*-Interaktionspartnern wurden isogenisierte Männchen des Genotyps FRT80B/FRT80B einer EMS-Mutagenese unterzogen und gegen virginelle Weibchen des Genotyps *GMRGal4/(CyO)* ; *kette^{myr22-2}/TM6* gekreuzt. Da *GMRGal4* in Homozygose nicht zur Letalität führt, konnten auch homozygote virginelle Weibchen verwendet werden, was zu einer größeren Menge an für den Versuch relevanten Tieren in der F1-Generation führte. Die Tiere der F0-Generation wurden verworfen und die Nachkommenschaft bis zum Schlüpfen weiter auf 25 °C inkubiert. Sollte bei der Mutagenese ein Gen verändert worden sein, das für einen Interaktionspartner von KETTE codiert, könnte das zu Veränderungen des Phänotyps führen. Die F1-Generation wurde am Binokular auf solche Veränderungen gescreent und die Stämme durch Auskreuzen gegen *w⁻*-Doppelbalancertiere etabliert. Die Menge der gesichteten Tiere wurde durch Wiegen bestimmt, da das Gewicht einer *Drosophila* mit 0,001 g angegeben werden kann. Da die Hälfte der gesichteten Fliegen Träger des TM6-Balancer war, wurde das Ergebnis durch 2 dividiert. Mit den etablierten Stämmen wurde ein Rescreen durchgeführt, um die Echtheit des Phänotyps zu bestätigen. Das nachfolgende Kreuzungsschema verdeutlicht den Screen.



2.2.1.10 Interaktionspartnersuche mit Hilfe von Deletionen

Eine weitere Methode zur Gewinnung von Interaktionspartnern besteht in der Nutzung bereits bekannter Defizienzen. Ein Gen, das für einen Interaktionspartner kodiert, kann bei Ausfall der Genfunktion, wie sie in einer Defizienz vorliegt, zu Veränderungen des Phänotyps führen. Um eine möglichst vollständige Sichtung des Genoms zu ermöglichen, wurde das „Defizienzenkit“ des Bloomington Stock Centers gescreent, das insgesamt 92-95 % aller Polytänchromosomenbanden deletiert. Virginelle $\text{GMRGal4}/(\text{CyO}); \text{kette}^{\text{myr22-2}}/\text{TM6}$ -Weibchen wurden gegen Männchen der Defizienzen gekreuzt, und in der F1-Generation wurden die Auswirkungen der Defizienz auf den Augenphänotyp beurteilt.

2.2.1.11 Keimbahntransformation

Zur Analyse der Genfunktionen mit Hilfe von Überexpression („gain-of-function-analysis“) wurden durch Keimbahntransformationen transgene Fliegen erzeugt. Aufgrund des gezielten Einsatzes von Transposase bei der Injektion kommt es in frühen Embryonen zur Insertion der verwendeten Vektoren in das Genom. Da die verwendeten P-Elemente keine Transposase kodieren, werden auf diese Weise stabile Insertionen erzeugt, die dann in genetischen Ansätzen untersucht werden können. Für die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Keimbahntransformationen wurden ein Eppendorf Transjector 5246 und ein Eppendorf FemtoJet eingesetzt. Als Injektionskanülen wurden sowohl nachgeschliffene *femtotips* II Mikrokapillaren als auch selbstgezogene Glaskapillaren verwendet. Vor dem Einsetzen in das Gerät wurden die Kapillaren mit 2,5-5 μ l Injektionsmix befüllt.

2.2.1.11.1 Präparation der Embryonen

Zur Injektion wurden ausschließlich w^{1118} - Embryonen verwendet. Die Fliegen wurden bei 25 °C zur Eiablage gebracht und die Ablageplatten in Abständen von 30-60 Minuten gewechselt

- Dechorionisierung mit 2,5 % NaOCl für 3-5 min
- gründlich mit H₂O waschen
- auf einen Apfelsaftagarblock überführen und in einer Reihe anordnen, dabei das Alter der Embryonen und die einheitliche Ausrichtung kontrollieren
- Aufnahme der Embryonen mit einem mit Heptankleber beschichteten Deckglas
- Trocknung der Embryonen bei Raumtemperatur, bis bei Berührung mit einer Präpariernadel Falten in der Vitellinmembran sichtbar werden
- Embryonen mit 10S-Öl (Voletaf) überschichten und unverzüglich injizieren

2.2.1.11.2 Injektion der Embryonen

Nur Embryonen, die sich im Stadium des syncytialen Blastoderms befinden, dürfen für die Injektion verwendet werden.

- Embryonen und Injektionskapillare in einer Ebene ausrichten

- Injektion in den posterioren Pol des Embryos durch Einstechen der Kanüle (leichter Druck) und Betätigen des Injektionstasters (Kontrolle durch Lebensmittelfarbe im Injektionsmix möglich)
- nach der Injektion einer Embryonenreihe Deckglas in ein Wägeschälchen überführen und mit ausreichend 3S-Öl (Votalef) überschichten, um ein Austrocknen der Embryonen während der Entwicklung zu verhindern
- Schälchen bis zum Schlüpfen der Embryonen auf Raumtemperatur oder 18 °C halten
- geschlüpfte L1-Larven mit einer Präpariernadel in Futterröhrchen mit *Drosophila*-Standardmedium überführen

2.2.1.11.3 Selektion transgener Fliegen

Die geschlüpften Fliegen wurden in Einzelkreuzungen gegen Tiere des Genotyps w^- ; *CyO/Sp*; TM2/MKRS gekreuzt. Die Selektion der Transgenen erfolgte in der F1-Generation anhand der Augenfarbe (w^+), wobei die Stärke des w^+ -Markers mit dem Insertionsort variiert, so dass als Augenfarben alle Schattierungen zwischen hellgelb und tiefrot vorkommen können.

2.2.1.11.4 Lokalisation des Insertionsortes

Zur Bestimmung des Insertionschromosoms wurden die transgenen Fliegen erneut gegen Doppelbalancertiere ausgekreuzt. Der Insertionsort ergibt sich anhand der auftretenden Markerkombinationen durch Ausschluss der Chromosomen. Eine Selbstung der Transgenen zur Etablierung der stabilen Stämme wurde vorgenommen.

2.2.2 Histologische Methoden

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

Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt.

- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min
 - gründlich mit H₂O waschen
 - auf Apura-Papier gut trocknen
 - Überführung der MWP in Heptan
 - Überführung der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml Glasröhrchen
 - Zugabe des gleichen Volumens an Fix-Lösung (4 % Formaldehyd/PBS)
 - Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
 - Abnahme der wäßrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
 - zur Devitellinisierung ca. 10 sec kräftig schütteln
 - Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurz schütteln
 - 1 x waschen mit Methanol, 2 x waschen mit Ethanol
 - Einfrieren der Embryonen bei –20 °C bis zum Verwendungszeitpunkt, oder
 - 3 x kurz und anschließend 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
 - Inkubation in 10 % Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT
 - Inkubation des primären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT auf einem Taumler bei 4 °C ü.N.
 - 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Bei der Verwendung von Fluoreszenzantikörpern müssen alle folgenden Schritte unter Lichtabschluss erfolgen.
- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT auf einem Taumler für 2 h bei RT
 - 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
 - bei der Verwendung von Fluoreszenzantikörpern entfällt die Nachweisreaktion, zum Schutz der Färbung Embryonen in Fluoromount-G der Firma Biozol bis zur Verwendung bei 4 °C lagern oder

- antikörperspezifische Nachweisreaktion

2.2.2.2 Nachweisreaktionen

2.2.2.2.1 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

- Embryonen 2 x 15 min in NBT-Puffer waschen
- Embryonen in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT-Lösung in NBT-Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion in PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist (5-10 min)
- 3 x kurz mit PBT waschen
- 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- in 70 % Glycerin überführen

2.2.2.2.2 Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung

- Inkubation der Embryonen in 0,3 mg/ml DAB-Lösung und 1 µl/ml H₂O₂
- Stoppen der Färbereaktion in PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist (5-10 min)
- 3 x kurz mit PBT waschen
- 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- in 70 % Glycerin überführen

2.2.2.3 Kutikula-Präparationen

CyO-balancierte mutante Linien wurden zur Ablage gebracht und bei 25 °C für 12 h inkubiert. Da der Balancer CyO in Homozygose larval letal ist, ist es möglich, nach weiterer Inkubation der Ablageplatten für 48 h bei 25 °C die homozygot mutanten Embryonen herauszusammeln. An den Rand der Ablageplatten wurde Hefe gegeben, damit sich die Larven in diesem Bereich sammeln und leichter entfernt werden können. Die verbliebenen, letalen Embryonen wurden mit einem Pinsel von der Ablageplatte gesammelt und chemisch dechorionisiert (3-5 min in 50 % NaOCl). Nach einigen Waschschritten mit Leitungswasser wurden die Embryonen mit einem Pinsel in 1,5 ml

Reaktionsgefäße überführt, in denen bereits 1:1 Heptan/Methanol vorgelegt war. Durch kräftiges Schütteln für eine Minute wurden die Embryonen devitellinisiert und danach zweimal mit Methanol, einmal mit Ethanol und zweimal mit PBT gewaschen. Danach wurden die Embryonen in einen Tropfen Hoyers Medium/Milchsäure (1:1) überführt und eingedeckelt. Zur Klärung wurden die Kutikula-Präparationen ü. N. bei 65 °C inkubiert.

2.2.2.4 Untersuchungen an Imaginalscheiben

2.2.2.4.1 Fixierung von Imaginalscheiben

- Präparieren der Imaginalscheiben in eisgekühltem 1x PBS (Im Fall von anderen Imaginalscheiben als den Augen-Antennen-Imaginalscheiben empfiehlt es sich, die Larven vor der Präparation durch kurzes Eintauchen in ein 65 °C heißes Wasserbad zu töten.)
- Überführen der Imaginalscheiben in 4 % Formaldehyd/PBS oder 4 % PFA
- Fixierung der Augenimaginalscheiben für 40-45 min auf einem Schüttler bei RT
- 3 x 15 min waschen mit PBT

2.2.2.4.2 Antikörperfärbung an Imaginalscheiben

- Blocken mit 10 % Ziegen-Serum/PBT oder 3 % BSA für 1 h
- Antikörperinkubation bei 4 °C ü. N. (Für die IS werden die Antikörper in der gleichen Konzentration verwendet wie bei Antikörperfärbungen an Embryonen.)
- 3 x kurz, 3 x 20 min mit PBT waschen

Bei Fluoreszenz-Antikörpern sollten alle folgenden Schritte unter Lichtabschluss erfolgen.

- Inkubation des sekundären Antikörpers für 2-3 Stunden auf einem Schüttler bei RT
- 3 x kurz, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen

2.2.2.5 Untersuchungen an Puppen

Zur Untersuchung der Regulation des F-AKTIN-Zytoskeletts während der Entwicklung wurde als Modell die Ausbildung der mechanosensorischen Borsten auf dem Thorax der Fliegen gewählt. Um die Bildung der Borsten zu visualisieren, wurden auch Untersuchungen an Puppen vorgenommen.

2.2.2.5.1 Präparation der Puppen

- Präpuppen auf ein feuchtes Whatman-Papier in einem kleinen Petrischälchen legen und bei 25 °C 32-48 h entwickeln lassen (Zur Betrachtung anderer Entwicklungsprozesse kann die Wahl eines anderen Zeitfensters oder einer anderen Temperatur sinnvoll sein.)
- Puppen mit dem posterioren Teil lateral auf ein doppelseitiges Klebeband kleben
- Operkulum mit einer Pinzette abheben und mit einer feinen Schere vorsichtig die Puppenhülle auftrennen (Je nach Alter der Puppen kann dieser Schritt sehr kritisch sein.)
- Puppenhülle soweit wie möglich öffnen und Puppe vorsichtig mit einer Pinzette aus der Hülle heben
- Puppe auf ein doppelseitiges Klebeband in einer Petrischale legen (dorsal nach oben) und mit eiskaltem PBS überschichten
- Puppe vorsichtig lateral mit feiner Schere auftrennen und den dorsalen Teil abheben
- dorsalen Teil mit einer kleinen Spritze und PBS im Flüssigkeitsstrom reinigen (Die Flügelmuskulatur erst nach der Fixierung abtrennen)
- dorsalen Teil in ein Eppendorfgefäß mit eiskaltem PBS überführen

2.2.2.5.2 Fixierung der Puppen

- Puppen in 4 % PFA 20 min auf einem Taumler fixieren
- Puppen in 4 % PFA/ 0,1 % Triton 20 min auf einem Taumler nachfixieren
- 3-5 x je 20 min mit PBT waschen

2.2.2.5.3 Antikörperfärbungen an Puppen

- Blocken in 3 % BSA auf einem Taumler für 1 h
- Inkubation des primären Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 3 % BSA auf einem Taumler ü. N. bei 4 °C
- 3 x kurz, 3 x 20 min mit PBT waschen
- Inkubation des zweiten Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 3 % BSA auf einem Taumler für 2-3 h bei Raumtemperatur
- 3 x kurz, 3 x 20 min waschen mit PBT
- bei Fluoreszenzfärbungen zum Schutz der Färbung Puppen in Fluoromount G der Firma Biozol bis zur Verwendung bei 4 °C lagern.

Die Verdünnungen der Antikörper entsprechen im Wesentlichen denen für Färbungen an Embryonen oder Imaginalscheiben.

2.2.2.5.4 Phalloidinfärbungen an Puppen

Um F-AKTIN sichtbar zu machen, wurde Phalloidin verwendet, das in einer Verdünnung 1:100 dem Mix für den zweiten Antikörper zugegeben wurde. Desweiteren wurde die Färbung wie oben beschrieben behandelt.

2.2.2.5.5 Einbettung von Puppen

Um die longitudinalen AKTIN-Bündel der entwickelnden Borsten genau zu untersuchen, wird nach der Färbung die Flugmuskulatur entfernt. Danach wurden die Puppenteile so ausgerichtet, dass eine dorsale Aufsicht erhalten wurde. Ein Deckgläschen wurde mit „Füßchen“ aus Deckgläschen oder Knetmasse versehen und aufgelegt. Dauerhafter wird das Präparat, wenn die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt werden.

2.2.2.6 Untersuchungen an „neuro muscular junctions“ (NMJ)

Untersuchungen zur synaptischen Architektur der NMJ sind im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Genotypen durchgeführt worden. Verwendet wurden auch

Konstrukte, die mit *elavGal4* getrieben wurden, um eine Expression in den Boutons zu erhalten.

2.2.2.6.1 Präparation der L3-Larven (Wanderlarven)

L3-Larven werden einzeln in 65-70 °C heißem Wasser getötet und auf einen Objektträger gelegt.

- mit einer feinen Schere am posterioren Ende ein kleines Stück abtrennen, so dass ein gerader Schnitt entsteht
- Larve dorsal längs aufschneiden und den Mundhaken abtrennen, so dass ein schräger Schnitt entsteht (erleichtert die Orientierung der Larven nach der Färbung)
- Larve aufklappen und Gewebe bis auf die Muskulatur entfernen
- Larven in einem Eppendorfgefäß mit eisgekühltem PBS auf Eis sammeln
- PBS abnehmen und Larven in 4 % PFA oder 4 % Formaldehyd/PBS für 40 min fixieren
- Antikörperfärbung, wie unter Punkt 2.2.2.4. für Imaginalscheiben beschrieben, durchführen

Beim Einbetten der Larven ist darauf zu achten, dass sie mit der Kutikulaseite zum Objektträger und alle in eine Richtung ausgerichtet werden, um die Untersuchung des komplizierten Muskelmusters zu erleichtern.

2.2.2.7 Untersuchungen an adulten Fliegen

2.2.2.7.1 Fliegenphotographie

Photos von Fliegen wurden am Binokular MZ16 der Firma Leica gemacht. Die Fliegen wurden nach Genotyp getrennt und bei -20 °C in Eppendorfgefäßen für mindestens 15 min eingefroren. Eine Aufbewahrung von mehreren Wochen bei -20 °C erwies sich ebenfalls als unproblematisch. Für Aufnahmen von Kopf und Thorax wurden die Flügel und Beine entfernt und die Fliegen mit dem Abdomen auf doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger befestigt. Um Reflektionen auf Augen und Thorax zu vermeiden, empfiehlt es sich, das Licht durch einen Papierring zu filtern. Die

Aufnahmen erfolgten digital mit der Kamera „AxioCam HRC“ der Firma Zeiss, sowie der entsprechenden Anwendersoftware „AxioVision“.

2.2.2.7.2 Borstenpräparationen

Zur genaueren Auflösung der Borstenstrukturen wurden die Fliegen in Hoyers Medium/Milchsäure (1:1) überführt und ü. N. bei 65 °C inkubiert. Zur Aufnahme von Mikrochaeten wurden Kopf und Thorax mit Hilfe einer feinen Schere oder Skalpellklinge in kleine Stücke zerteilt, um ein Umknicken der Borsten beim Auflegen des Deckglases zu verhindern. Für die Aufnahmen von Makrochaeten wurde nur der ventrale Teil der Fliege abgetrennt und der vollständige Thorax ausgerichtet. Die Aufnahmen erfolgten digital an einem „AxioPhot“-Mikroskop der Firma Zeiss mit der Kamera „AxioCam HRC“ und der entsprechenden Anwendersoftware „AxioVision“.

2.2.2.8 Rasterelektronenmikroskopie

Alle rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem „Scanning Electron Microscope S-3000N“ der Firma HITACHI unter Verwendung der entsprechenden Anwendersoftware durchgeführt.

2.2.2.8.1 Vorbereitung von Fliegen für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

- Fliegen nach Genotyp sortieren und in Eppendorfgläser überführen
- 4 % PFA zugeben und 1,5 h auf einem Taumler fixieren
- 3 x 20 min mit PBT waschen
- PBT entfernen, Entwässern der Fliegen in einer Ethanolreihe bis zu 70 %igem Ethanol, dabei jeweils mindestens 2 h taumeln lassen. Die Fliegen bis 1 Tag vor der Verwendung bei Raumtemperatur darin aufbewahren
- Fliegen in 100 %igem Ethanol überführen und mind. 6 h darin belassen
- Fliegen jetzt im K850X der Firma EMITECH gemäß Protokoll oder im Exicator wie folgt trocknen:

Nach Genotypen getrennt in gereinigte Petrischälchen überführen, den überschüssigen Ethanol absaugen und die Petrischälchen zum Schutz mit Gaze bespannen.

Trocknung der Fliegen im Exicator für 3-5 h

2.2.2.8.2 Goldbedampfung

Die Fliegen werden vorsichtig und nach Genotypen getrennt in der gewünschten Orientierung auf kleine Aluminiumplättchen (rechteckig, etwa 1,5 x 1 cm) aufgebracht, auf die zuvor ein Tropfen Wachs oder ein Kohleklebeplättchen aufgebracht wurde. Es ist darauf zu achten, dass die Tiere möglichst staubfrei und vorsichtig behandelt werden, da sonst die Borsten verkleben können und jedes Staubkorn bei der Elektronenmikroskopie sichtbar wird. Danach erfolgt die Goldbedampfung in einem K550X der Firma EMITECH. Die bedampften Präparate können sofort rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden. Es ist jedoch auch eine längere Lagerung (bis zu mehreren Jahren) möglich.

2.2.2.9 *whole-mount in-situ* Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen

2.2.2.9.1 Fixierung der Embryonen

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte gewaschen und in Multiwell-Plexiglasplatten überführt
- Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 3-5 min
- gründlich mit H₂O waschen
- auf Apura-Papier gut trocknen
- Überführung der MWP in Heptan
- Überführung der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml Glasröhrchen
- Zugabe des gleichen Volumens an Fix-Lösung (8 % FA/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 30 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wäßrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- zur Devitellinisierung ca. 10 sec kräftig schütteln

- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurz schütteln
- 1 x mit Methanol, 2 x mit Ethanol waschen
- Überführung in Ethanol (96 %) zur Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Zur Überprüfung einer Expression an homozygot mutanten Tieren wurden die entsprechenden Embryonen unter Verwendung eines GFP-Balancers vor der Fixierung unter dem Fluoreszenzbinokular von den Heterozygoten sowie den homozygoten Balancertieren getrennt und dann wie oben beschrieben behandelt.

2.2.2.9.2 Herstellung von RNA-Proben

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *whole-mount in situ*-Hybridisierungen wurden ausschließlich Digoxigenin-markierte Proben verwendet. Als DNA-Template wurden cDNAs verwendet, die in der eingegrenzten Region liegen und daher möglicherweise Transkripte des *mmy*-Gens darstellen. Mittels *in vitro*-Transkription mit einem RNA-Labeling-Mix (Boehringer, Mannheim) wurden daraus gemäß den Angaben des Herstellers die Riboproben erstellt. Die Behandlung der cDNA-Klone, die Isolierung der DNA und die Herstellung der RNA-Proben ist unter Punkt 2.2.3.3 beschrieben.

2.2.2.9.3 Hybridisierung

Die im Folgenden verwendeten Lösungen wurden mit DEPC- H_2O angesetzt.

- 3 x 5 min mit PBT-DEPC waschen
- 6 min in $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nicht mehr kochendem) Wasserbad inkubieren
- 3 min auf Eis inkubieren
- 20 min in 5 % Formaldehyd/PBT-DEPC fixieren (2. Fixierung)
- 3 x 10 min waschen mit PBT-DEPC
- 10 min waschen mit PBT-DEPC / Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1
- 10 min waschen mit Hybridisierungspuffer
- Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 90 min
- verschiedene Verdünnungsstufen der markierten Probe in Hybridisierungslösung kurz aufkochen, danach sofort auf Eis kühlen

- Hybridisierungslösung gegen die denaturierte Probe in Hybridisierungslösung austauschen und ü.N. bei 60 °C inkubieren
- 30 min in Hybridisierungspuffer/PBT-DEPC (1:1) bei 60 °C waschen
- 30 min in Hybridisierungspuffer bei 60 °C waschen
- 5 x 20 min in PBT-DEPC bei 60 °C waschen
- 10 min in PBT-DEPC bei RT waschen
- Inkubation mit präabsorbierten anti-DIGOXIGENIN Antikörper/PBT-DEPC (1:2000) für 2 h
- 5 x 10 min in PBT bei RT waschen

2.2.2.9.4 Nachweisreaktion

- 2 x 10 min in NBT-Puffer waschen
- Embryonen in 3,5 µl/ml NBT-Lösung und 4,5 µl/ml BCIP in NBT-Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist
- 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen

2.2.2.9.5 Einbetten von Embryonen nach *in-situ* Hybridisierung

- Entwässern der Embryonen in einer Alkoholreihe: 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % Ethanol
- Embryonen in Kanadabalsam-Methylsalicylsäureester (1:1) einbetten
- Deckgläschen auflegen (eventl. mit „Füßchen“)

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

XL1-Blue oder DH5α-Zellen werden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Abend werden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und ü.N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Zwei 500 ml Kolben LB-Flüssigmedium werden mit jeweils der Hälfte der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 37 °C im Schüttler inkubiert (3-5 h). Die Kultur wird für 15

min auf Eis inkubiert und dann in einem vorgekühlten Rotor bei 4.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 1 l kaltem Millipore-H₂O resuspendiert und danach für 15 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,5 l kaltem Millipore-H₂O resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wird in wenig kaltem 10 % Glycerin/Millipore-H₂O resuspendiert, wobei das Gesamtvolumen 2–3 ml nicht überschreiten sollte. Das sollte einer Zellkonzentration von 1-3 x 10⁸ Zellen entsprechen. 45 Aliquots der Suspension werden auf Eis in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots werden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Die Bestimmung der Transformationskompetenz, die nicht unter 4 x 10⁷ Kolonien/µg pUC18 liegen sollte, erfolgt durch Transformation eines Aliquots mit 10 pg pUC18 DNA. Der Transformationsansatz wird ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag kann die Anzahl der Kolonien bestimmt werden.

2.2.3.2 Elektrotransformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Transformationen wurden mit einem Gene-Pulser der Firma BIORAD gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Je Transformationsansatz wurde ein Aliquot kompetenter *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit der entsprechenden DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Nach Einfügen der Küvette in den Gene-Pulser wurde der Impuls bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm (bei -25 µF, -1,8 kV, 200 Ω) und einer Zeitkonstante zwischen 3,8 und 5 ms ausgelöst. 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium wurde schnell zugegeben und der Ansatz mit einer sterilen Pasteurpipette in ein Reagenzglas überführt, welches bei 37 °C für 20-30 min inkubiert wurde. Danach wurden die transformierten Zellen auf einem geeigneten Selektionsmedium ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.3 Behandlung von cDNA-Klonen

2.2.3.3.1 Lösung von DNA und Transformation in Zellen

Die vom DGRC erhaltene DNA wurde auf einem Filterpapier getrocknet geliefert und dann wie folgt gelöst:

- 15 µl steriles Millipore-H₂O draufgeben, einmal in der Pipettenspitze aufziehen und werfen
- 30 µl steriles Millipore-H₂O zugeben, mehrfach in der Pipettenspitze aufziehen, um die DNA vom Papier zu lösen, und dann in ein steriles Eppendorfgefäß geben
- DNA einfrieren oder direkt zur Transformation in elektrokompente Zellen, wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben, verwenden

2.2.3.3.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

2.2.3.3.2.1 „Kochmini“-Methode

- 2 ml LB-Medium (mit Antibiotika zur Selektion) mit Einzelkolonien animpfen und ü. N. bei 37 °C im Schüttler inkubieren
- die Bakterienkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- in einer Tischzentrifuge 20 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren und den Überstand abgießen
- 250 µl STET zum Pellet geben und durch Vortexen das Pellet gut lösen
- 1 min kochen, anschließend in einer Tischzentrifuge 7 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand zu 200 µl Isopropanol und 21 µl Ammoniumacetat in ein neues Eppendorf-Gefäß schütten und mischen
- zur Fällung in einer Tischzentrifuge für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase-H₂O resuspendieren

2.2.3.3.2 „Boehringermini“-Methode

Die Präparation der PlasmidDNA wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei zur Steigerung der Konzentration bei der Elution die Hälfte des angegebenen Volumens (50 µl) eingesetzt wurde.

2.2.3.3.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation größerer DNA-Mengen erfolgt aus einer 75 ml ü. N.-Kultur, die mit einem Antibiotikum zur Selektion versetzt ist und mit Einzelkolonien angeimpft wird. Für die Midi-Präparation wurde ein DNA-Präparations-Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH Düsseldorf) entsprechend dem angegebenen Protokoll verwendet.

2.2.3.4 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde

In ein eisgekühltes Eppendorfgefäß werden gegeben:

- 1 µg linearisierte Plasmid DNA
- 2 µl DIG RNA Labeling Mix, 10 x konz. (Boehringer, Mannheim)
- 2 µl 10 x Transkriptionspuffer
- ad 18 µl RNase-freies ddH₂O
- 2 µl RNA-Polymerase (SP6, T7 oder T3)
- mischen und leicht zentrifugieren
- 2 h bei 37 °C inkubieren
- Zugabe von 2 µl DNase I, RNase-frei zur Entfernung der Template-DNA
- 15 min bei 37 °C inkubieren
- 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 -70 °C 30 min fällen
- bei 4 °C für 15 min mit 12.000 g zentrifugieren
- mit 50 µl 70 % Ethanol waschen, trocknen und in 100 µl RNase-freiem H₂O aufnehmen

2.2.3.5 DNA-Restriktionen

Die DNA-Restriktionen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme.

2.2.3.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel

Die Gelelektrophorese wird bei niedriger Spannung durchgeführt; die Elution erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Düsseldorf), die Arbeiten wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.7 Gelelektrophorese

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 85-150 V durch Horizontal-Gelelektrophorese in Agarosegelen (0,8 bis 1,2 % in TBE) mit Ethidiumbromid (10 mg/ml H₂O, 3 µl/100 ml). Als relatives Maß für die Größe der DNA-Fragmente dient eine 1 kb-Leiter (GIBCO/BRL).

2.2.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wird ein zweckmäßiges Volumen (möglichst gering!) auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Standard dient 1 µg einer 1 kb-Leiter (Gibco/BRL). Die Konzentration der DNA-Lösung wird dann durch einen Vergleich der relativen Fluoreszenz-Intensitäten unter UV-Licht bestimmt.

Alternativ konnte die Konzentration auch photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde das BioPhotometer der Firma Eppendorf, Hamburg verwendet.

2.2.3.9 Isolierung genomischer DNA

2.2.3.9.1 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen: Salzfällungsmethode

- ca. 40 Fliegen für mind. 10 min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß einfrieren
- Zugabe von 100 µl Lysispuffer und Zerstoßen der Fliegen mit einem Pistill bis zur Homogenität
- Zugabe von weiteren 700 µl Lysispuffer und sorgfältiges Mischen

- Inkubation für 30 min bei 65 °C
- Zugabe von 154 µl 8M Kaliumacetat, sorgfältiges Mischen und Inkubation für 30 min auf Eis
- Zentrifugation für 30 min bei 10 000 rpm
- Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und erneute Zentrifugation für 15 min bei 10 000 rpm
- Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und Fällung der DNA durch Zugabe von 75 µl 2M NaCl und 700 µl Isopropanol
- mischen durch vorsichtiges Invertieren
- Zentrifugation bei 13 000 rpm für 15 min, Waschen des Pellets mit 200 µl 70 % Ethanol und erneutes Zentrifugieren
- Trocknung des Pellets unter einer Lampe
- Resuspension des Pellets in 50 µl RNase-Wasser

2.2.3.9.2 Isolierung genomischer DNA für PCR: Einzelfliegenprotokoll

Eine schnelle und gute Methode zur Isolierung von DNA für PCR-Analysen bietet das Einzelfliegen-Protokoll.

- Eine Fliege (möglichst ein Weibchen, da sich daraus mehr DNA isolieren lässt) wird zur Immobilisierung kurz eingefroren
- 50 µl Squib/200 µg/ml Proteinase K werden in einer Gilson P-200-Pipette aufgenommen, die Fliege mit der Pipettenspitze zerdrückt und dann der Puffer aus der Pipettenspitze ausgestoßen
- Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min bei 37 °C
- zur Inaktivierung der Proteinase K den Ansatz für 2 min bei 85 °C inkubieren
- Lagerung der DNA bei 4 °C bis zur Verwendung

Zur PCR wurden 1-4 µl der so isolierten DNA eingesetzt.

2.2.3.10 PCR

Die PCR ist eine schnelle, effektive und genaue Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurde ein MJ

Research PTC 200 DNA-Engine (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf) im „calculated“-Temperaturmodus verwendet.

2.2.3.10.1 Reaktionskomponenten

Der folgende Reaktionsansatz wurde für Standard-PCR-Reaktionen im 50 µl-Volumen angesetzt. Für Reaktionen im 25 µl-Volumen wurde der Ansatz entsprechend halbiert.

Komponente	eingesetztes Volumen	finale Konzentration
DNA-Template		Genom. DNA: 100ng Plasmid-DNA: 1-10 ng
10 x PCR-Puffer	5 µl	1 x
Primer 1 (2 µM)	10 µl	400 nM
Primer 2 (2 µM)	10 µl	400 nM
MgCl ₂	3 µl	1,5 mM
dNTP's	1 µl	200 µM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,2 µl	1 U
steriles H ₂ O	ad 50 µl	

2.2.3.10.2 Temperaturprofile

Für die Ausbeute und Spezifität der PCR-Reaktionen sind neben den genannten Konzentrationen auch Temperatur, Zeit und die Anzahl der einzelnen Amplifikationsschritte wichtig. Entsprechend der Größe des zu erwartenden Fragmentes wurden verschiedene Programmschemata verwendet, die sich in Extensions- und Annealingzeiten unterscheiden. Die Annealingtemperaturen, die zwei bis fünf Grad unter dem niedrigeren T_M -Wert der beiden Primer liegen sollten, wurden je nach Primerpaar zusätzlich entsprechend verändert.

2.2.3.10.2.1 Programmschema „AMP“

Für Fragmente bis 800 bp-Länge:

Reaktionsschritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in min) / Wiederholungen
1. Initiale Denaturierung	94	01:00
2. Denaturierung	94	00:40
3. Annealing	je nach Primerpaar	00:40
4. Extension	75	00:40
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4		29 x
6. Finale Extension	75	05:00
7. Kühlen	4	bis zur Verwendung

2.2.3.10.2.2 Programmschema „LAMP“

Für Fragmente bis 2 kb-Länge:

Reaktionsschritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)/ Wiederholungen
1. Initiale Denaturierung	94	01:00
2. Denaturierung	92	00:40
3. Annealing	je nach Primerpaar	00:40
4. Extension	75	02:00
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4		29 x
6. Finale Extension	75	05:00
7. Kühlen	4	bis zur Verwendung

2.2.3.10.2.3 Programmschema „LLAMP“

Für Fragmente > 2 kb:

Reaktionsschritt	Temperatur (in°C)	Zeit (in min)/ Wiederholungen
1. Initiale Denaturierung	94	01:00
2. Denaturierung	92	00:10
3. Annealing	je nach Primerpaar	00:10
4. Extension	75	04:00
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4		34 x
6. Finale Extension	75	05:00
7. Kühlen	4	bis zur Verwendung

2.2.3.10.3 Inverse PCR

Zur Amplifikation von DNA-Bereichen, in denen P-Elemente liegen, steht eine spezielle Art der PCR zur Verfügung. Für die Inverse PCR (Ochman et al., 1988) wird die Template-DNA zunächst mit Restriktionsenzymen geschnitten, deren Erkennungssequenzen häufig auftreten und die dementsprechend häufig schneiden. Anschließend wird die DNA in stark verringerter Konzentration ligiert, so dass zirkuläre Moleküle entstehen. Die Ligation dient als Template der nun folgenden PCR, wobei zwei Primer jeweils 5' bzw. 3' im P-Element gewählt werden können, die gegensätzlich orientiert sind.

2.2.3.10.3.1 Einzelfliegen-Inverse-PCR

Die Präparation der DNA aus Einzelfliegen erfolgte wie unter Punkt 2.2.3.9.2 beschrieben, wobei 1 µl 0.1 M PMSF als Proteaseinhibitor zugesetzt wird.

- 8 µl der genomischen DNA werden in einem Endvolumen von 20 µl mit folgenden Restriktionsenzymen restringiert: *CfoI*, *MspI*, *RsaI* und *NdeII*. Der Verdau wird für 20 min bei 37 °C durchgeführt und das Enzym anschließend für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

- 6 µl der verdauten DNA werden dann in einem Endvolumen von 10 µl religiert (1 µl 10 x Ligations-Puffer, 1 µl *T4*-Ligase und 2 µl H₂O). Die Reaktion wird für 60 min bei RT durchgeführt.
- Inaktivierung des Enzyms bei 95 °C für 2-3 min
- Kühlen des Ansatzes bei 4 °C
- Amplifikation des gesamten Ansatzes in einem Endvolumen von 50 µl (Konzentrationen und Reaktionskomponenten sind unter 2.2.3.10.1 angegeben)

2.2.3.10.3.2 Programmschema „INV“

Reaktionsschritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)/ Wiederholungen
1. Initiale Denaturierung	94	01:00
2. Denaturierung	92	00:30
3. Annealing	je nach Primerpaar	01:00
4. Extension	75	03:30
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4		34 x
6. finale Extension	75	05:00
7. Kühlen	4	bis zur Verwendung

2.2.3.10.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das *Qiaquick PCR Purification Kit* (Fa. Qiagen, Düsseldorf) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.10.5 Klonierung von PCR-Produkten

Eine konventionelle Klonierung von PCR-Produkten ist aufgrund der 3'-Nucleotidtransferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase, die zu 3'-Adenin-Überhängen der PCR-Amplifikate führt, schwierig. Daher bietet sich eine Klonierung mit Vektoren an,

die bereits mit 5`-Thymin-Überhängen versehen sind. In dieser Arbeit wurde das *pGEM-Teasy-PCR-cloning kit* der Firma Promega, Mannheim, verwendet.

2.2.3.11 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen wurden mit den Amersham Sequenzierungs-Kits *Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit* oder *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham Bioscience) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auswertung der Sequenzierungsreaktionen wurde ein *ABIPRISM 310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Weiterstadt) oder ein *MegaBACE 1000* (Molecular Dynamics, Amersham Biotech) verwendet. Die Analyse der Sequenzdaten wurde mit dem Programm *Lasergene DNASTAR Software Package* (GATC, Konstanz) durchgeführt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Western Blot-Analyse

2.2.4.1.1 Gewinnung der Proteinprobe aus Embryonen oder Larven

- gewaschene, NaOCl-gebleachte Embryonen oder Larven (ungebleacht) in ein Eppendorfgefäß überführen (es sollte kein Wasser mehr auf den Embryonen stehen) und bei -20 °C für mind. 10 min einfrieren
- ca. 50 µl Lysispuffer für Embryonenlysate auf Eis zugeben (Die genaue Menge hängt von der Menge der Embryonen/Larven ab. Sie sollten mind. 2 mm bedeckt sein)
- Gewebe mit einem Pistill auf Eis zerquetschen
- bei 4°C und 14 000 rpm 15 min zentrifugieren (Kühlzentrifuge vorkühlen lassen)
- Proteinlösung zwischen Pellet und Fettschicht aufsaugen und in ein frisches Eppendorfgefäß auf Eis überführen
- Bei 4 °C und 14 000 rpm 15 min zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß auf Eis übertragen

2.2.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

- Bradfordlösung mit H₂O in geeigneter Menge (1:4) ansetzen, vortexen und in Eppendorfgefäße zu je 1 ml abfüllen
- eines als Nullabgleich verwenden, den anderen je 1 µl der Probe zugeben
- je 400 µl in Küvetten einfüllen und messen
- Pro Gelspur sollten etwa 20 µg Protein aufgetragen werden. Ab einer Konzentration von etwa 4 µg/µl sollte im folgenden 2x Probenpuffer verwendet werden, bei geringerer Konzentration empfiehlt sich eher ein 5 x Probenpuffer.

Die entsprechenden Aliquots können bis zur Verwendung bei -70 °C eingefroren werden

2.2.4.1.3 Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels (*Bio-Rad System*)

Alle Arbeiten sollten mit Nitrilhandschuhen ausgeführt werden.

- 2 passende Glasscheiben gründlich reinigen und abtrocknen
- kurz mit Ethanol abreiben
- nach Anleitung in die Halter einspannen und auf planen Stand achten

Trenngel für zwei kleine Gele		
	7,5 %	10 %
ddH ₂ O	3650 µl	3030 µl
4x Trenngelpuffer	1900 µl	1900 µl
10 % SDS	75 µl	75 µl
Acrylamidlösung	1900 µl	2500 µl
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

- Trenngel bis ca. 0,5 cm unterhalb des Kamms einfüllen, mit Isopropanol überschichten und auspolymerisieren lassen

- Isopropanol abgießen und mit Whatmanpapier abtrocknen (Gel nicht berühren)
- Sammelgel einfüllen, Kamm von der Seite her einsetzen und auspolymerisieren lassen
- Unterkante der Taschen mit einem Edding markieren und Kamm herausziehen

2.2.4.1.4 Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

- Proben aus -70 °C auf Eis auftauen lassen
- Eppendorfgefäße mit Klammern schließen und im Thermoblock bei 100 °C 3 min aufkochen (Marker nicht vergessen)
- Proben und Marker 3 min bei 13 000 rpm zentrifugieren und wieder auf Eis stellen
- entsprechende Menge an Proteinlösung mit der Hamiltonspritze aufziehen und auf das Gel auftragen
- Marker nach Angaben des Herstellers auftragen
- falls Taschen leer bleiben, diese mit je 5 µl 2x Probenpuffer beschicken, damit die Proben gerade laufen

2.2.4.1.5 Gelelektrophorese

Sammelgel für zwei kleine Gele	
ddH ₂ O	3000 µl
4x Sammelgelpuffer	1250 µl
10 % SDS	50 µl
Acrylamidlösung	665 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

-
- Kammer bis zur Glasoberkante mit Elektrophoresepuffer füllen
- Kammer an Spannungsgeber anschließen und Proben bei 80 V ca. 15 min in das Sammelgel einlaufen lassen

- Das Gel mind. 2 h bei 100 V laufen lassen
- Glasplatten mit einem Keil trennen und Sammelgel verwerfen
- Handschuhe mit Western-Puffer befeuchten und das Trenngel in eine Schale mit Westernpuffer legen

2.2.4.1.6 Transfer auf die Membran

- SDS-Gel in Westernpuffer 20-60 min inkubieren
- in der Zwischenzeit je zwei Blottingpapiere zuschneiden (etwas größer als das Gel)
- je Gel eine Transfermembran zuschneiden
- Blottingpapier 10 min in Westernpuffer einweichen
- Transfermembran 10–15 sec in Methanol aktivieren
- Transfermembran in Westernpuffer überführen und für mindestens 5 min inkubieren
- in das Blottinggerät legen:
 - Auflage mit Westernpuffer anfeuchten
 - Blottingpapier
 - Transfermembran
 - Gel
 - Blottingpapier
- mit einer Glaspipette über den Stapel rollen um Luftblasen auszutreiben
- Deckel aufsetzen und 30-45 min bei 15 V laufen lassen
- Membran kennzeichnen

2.2.4.1.7 Nachweis von Proteinen über Antikörperfärbung

- Transfermembran in ein Falcontube übertragen (Proteinseite nach innen) und 10 min waschen in TBS/Tween
- 30 min in 7,5 ml 10 % Milchpulver/TBS/Tween blocken
- Inkubation des ersten Antikörpers in 10 % Milchpulver/TBS/Tween bei 4 °C auf dem Taumler ü. N.
- 1 h waschen in TBS/Tween, dabei 3-5 x den Puffer wechseln
- Inkubation des zweiten Antikörpers in 10 % Milchpulver/TBS/Tween für 1 h bei RT

- 5 x 15 min waschen mit TBS/Tween
- Membran in eine schräggestellte Schale geben und in der unteren Ecke *ECL Western Blotting Detection Reagent* ansetzen
- Je 1 ml Lösung 1 und Lösung 2 mischen
- mit der Pipette über die Membran laufen lassen
- Membran in eine *Hypercasette* einlegen
- in der Dunkelkammer Röntgenfilm zuschneiden und in die Kassette legen
- 30 sec und danach 3 min entwickeln lassen, je nach Ergebnis auch länger
- belichteten Film entwickeln lassen

2.2.5 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden an *Drosophila* Schneider $2R^+$ ($S2R^+$)-Zellen der Firma Invitrogen durchgeführt.

2.2.5.1 Kultivierung von S2-Zellen

- Zellen in 10 ml Schneiders *Drosophila* Medium (GIBCO)/10 % FBS (hitzeinaktiviert) unter Zugabe von 50 Units Penicillin und 50 Units Streptomycin-Sulfat pro ml bei 25 °C bis zu einer Zelldichte von 6×10^6 bis 20×10^6 kultivieren
- Zellen 1:5 verdünnen und in eine neue Kulturflasche passagieren

2.2.5.1.1 Antikörperfärbung an S2-Zellen

- zur Verbesserung der Adhärenz Deckgläschen mit Fibronectin (1:100 in PBS) beschichten
- Zellen in 24-Well-Platten auf den beschichteten Deckgläschen mit 1×10^6 Zellen pro ml Medium aussäen und ü. N. bei 25 °C kultivieren
- Medium abnehmen und Zellen in 4 % PFA in PBS (0,5 ml /Well) für 15 min fixieren
- 3 x 5 min mit PBS waschen
- 3 min mit 0,5 % Triton X-100/PBS (1 ml/Well) permeabilisieren

- 2 x 5 min waschen mit PBS
- 1 h blocken mit 3 % BSA/PBS
- Inkubation des 1. Antikörpers in geeigneter Verdünnung für 2 h bei RT (300µl/Well)
- 3 x 10 min waschen mit PBS
- Inkubation des 2. Antikörpers in geeigneter Verdünnung (1:100-1:2000) in 3 % BSA/PBS für 1 h bei RT
- 3 x 5 min waschen mit PBS
- 1 x waschen mit Millipore-H₂O
- Mit der Zellseite zum Objektträger in ein fluoreszenzstabilisierendes Medium (Mowiol) einbetten

2.2.5.2 Transfektion von S2-Zellen

- Zellen wie oben beschrieben aussäen und ü. N. bei 25 °C kultivieren
- pro Well einen Transfektionsansatz vorbereiten:
 - 100 µl Schneiders *Drosophila* Medium (GIBCO)
 - 2 µl Fu Gene 6 s/µg DNA
 - 0,5 µg der zu transfizierenden DNA (z.B. UAS Konstrukt und *act5CGal4* Gal4 mischen und zugeben)
 - 15 min bei RT inkubieren
- Überstand abnehmen und 100 µl des Transfektionsansatzes und 400 µl Schneiders *Drosophila* Medium pro Well zugeben und ü. N. bei 25 °C inkubieren
- Überstand durch Schneiders *Drosophila* Medium ersetzen und Zellen am folgenden Tag wie unter Punkt 2.2.5.1.1 beschrieben färben

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gene charakterisiert, die während der Ausbildung des axonalen Musters im embryonalen ZNS von *Drosophila melanogaster* von essentieller Bedeutung sind. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Zuordnung des phänotypisch analysierten Gens *mummy* (*mmy*) zu einer Transkriptionseinheit, sowie ersten Untersuchungen zur intrazellulären Funktion. Im zweiten Teil wurde die Funktion des Gens *kette* (*kte*) in adulten Geweben betrachtet und auf genetischer Basis nach Interaktionspartnern gesucht. Ein besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die durch Analysen von Homologen in anderen Organismen entdeckten Kandidaten, die die Funktion von *kette* mit der Regulation des AKTIN-Zytoskeletts koppeln. Der dritte Teil dieser Arbeit beschreibt die phänotypische Analyse des bekannten Interaktionspartners *dreadlocks* (*dock*) und dessen Einfluss auf die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts anhand der mechanosensorischen Borsten als Modellsystem.

3.1 Untersuchungen zum Gen *mummy* (*mmy*)

3.1.1 Die Kartierung auf Basis von „male recombination“

Ein besonderes Interesse bei der Untersuchung des Gens *mmy* galt der Korrelation mit einer Transkriptionseinheit. Die bisherigen Untersuchungen kartierten das Gen in die Region 26D7 auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila melanogaster* (Schimmelpfeng, 2000; Strunk, 2001). Ein weitergehender Ansatz sah die Kartierung des Gens auf Basis der „male recombination“ vor. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Männchen, die sowohl ein Transposon als auch eine Transposasequelle tragen, mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 1 % im näheren Umfeld des Transposons rekombinieren (Preston und Engels, 1996). Sind beide Seiten eines Gens mit rezessiven Markern versehen, kann aufgrund der Markerkombination auf die Lage des Gens relativ zu dem verwendeten Transposon geschlossen werden (s. M & M 2.2.1.8). Dieser Versuch wurde mit den zwei Allelen *mmy*^{H1-20} und *mmy*^{Q1-80} durchgeführt. Tiere der generierten markierten Stämme, die zusätzlich eine Transposasequelle trugen, wurden gegen die EP-Linien *EP(2)2016*, *EP(2)1228*,

EP(2)2180 und *EP(2)2108* gekreuzt und die Nachkommen gegen einen Multimarkerstamm zurückgekreuzt, um rekombinante Tiere ausfindig zu machen, die im Anschluss auf das Vorhandensein der *mmy*-Mutation getestet wurden. Es konnte nur eine Rekombinante für das Allel *mmy*^{Q1-80} mit dem *EP(2)2016* ausgewertet werden. In der entsprechenden Kreuzung fanden sich keine Tiere, die heterozygot für den rezessiven Marker *al*^l und homozygot für den rezessiven Marker *px*^l waren, was eine Lokalisation des EP-Elementes distal von *mmy* indiziert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den früher erhaltenen Daten der molekularbiologischen Analyse der Exzisionsmutanten des *EP(2)2016* (Strunk, 2001).

3.1.2 Kartierung über Deletionsmutanten

Um den für die Lokalisation von *mummy* fraglichen Bereich eingrenzen zu können und das für die „male recombination“ erhaltene Ergebnis zu überprüfen, wurde eine Komplementationsanalyse mit Defizienzen der Region 26D durchgeführt. Viele der neuen im *Bloomington Stock Center* erhältlichen Defizienzen mit molekular definierten Bruchpunkten konnten in diese Analyse einbezogen werden (Ryder *et al.*, 2004). Das in Abb. 8 dargestellte Schema verdeutlicht die Lage der verwendeten Defizienzen im Bereich der genomischen Region 26D, wie sie vom *Bloomington Stock Center* und der *Flybase* angegeben werden. Eine weitere Deletionsmutante, *Df(2L) Dwee-Delta5*, deren Bruchpunkte nach Angaben der *Flybase* bei 27A; 28A liegen, komplementierte die *mmy*-Allele *mmy*^{G1-31} und *mmy*^{A2016-1} in Transheterozygose, so dass eine Lokalisation von *mummy* in diesem Bereich ausgeschlossen werden konnte. Im Falle eines zutreffenden Ergebnisses der „male recombination“-Analyse wäre somit der für den *mummy*-Lokus in Frage kommende Bereich auf die Region zwischen der EP-Insertion *EP(2)2016* und dem Bruchpunkt der Defizienz *Df(2L) Dwee-Delta5* bei 27A eingeschränkt. Für die weitere Analyse der Region wurden neben den vier EMS-induzierten *mmy*-Allelen, *mmy*^{H1-20}, *mmy*^{Q1-80}, *mmy*^{G1-31} und *mmy*^{J1-201}, auch Exzisionsmutanten zweier verschiedener P- bzw. EP-Element-Linien, *l(2)k09923* und *EP(2)2016* auf Komplementation getestet. Diese Exzisionsmutanten zeigen den *mmy*-Phänotyp und komplementieren die EMS-Allele nicht (Schimmelpfeng, 2000; Strunk,

2001). Die Ergebnisse der Komplementationsanalyse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 2: Komplementationsanalyse von *mummy* mit Deletionsmutanten

<i>mummy</i>- Allele	Verwendete Defizienzen							
	Df(2L) <i>ED380</i>	Df(2L) <i>ED369</i>	Df(2L) <i>ED6461</i>	Df(2L) <i>Exel9038</i>	Df(2L) <i>Exel6016</i>	Df(2L) <i>Exel7027</i>	Df(2L) <i>BSC6</i>	Df(2L) <i>BSC7</i>
<i>mmy^{HI-20}</i>	n. d.	n. d.	letal	vital	vital	vital	letal	n. d.
<i>mmy^{JI-201}</i>	vital	vital	letal	vital	vital	vital	n. d.	vital
<i>mmy^{G1-31}</i>	n. d.	n. d.	n. d.	vital	vital	vital	n. d.	n. d.
<i>mmy^{Q1-80}</i>	n. d.	n. d.	n. d.	vital	vital	vital	n. d.	n. d.
<i>mmy^{A2016}</i>	vital	vital	letal	vital	vital	vital	letal	vital
<i>mmy^{dk09923}</i>	vital	vital	n. d.	vital	vital	vital	letal	vital.

Zuzüglich zu den in der Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen wurden die Defizienzen *Df(2L)ED380*, *Df(2L)ED369* und *Df(2L)ED6461* auf Letalität in Transheterozygose getestet. Alle Kombinationen wiesen keine Komplementation auf. Auch die *Df(2L)6016* führt in Transheterozygose zu *Df(2L)ED380* zur Letalität.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, haben sich die getesteten *mmy*-Allele gegenüber den jeweils getesteten Defizienzen einheitlich verhalten. In Abb. 8 ist das Ergebnis der Komplementationsanalyse schematisch dargestellt. Die grau unterlegte Fläche bezeichnet den für die Lokalisation möglichen Bereich, der ungefähr 12 Transkriptionseinheiten umfasst. Dieser Bereich ist in Abb. 9 vergrößert dargestellt. Da die *Df(2L)BSC7* nicht molekular charakterisiert ist, lässt sich die genaue Anzahl der Transkriptionseinheiten nicht ohne weiteres feststellen. Der proximal von *EP(2)2016* gelegene Teil in diesem Bereich umfasst etwa neun Transkriptionseinheiten, der distale Teil etwa zwei, so dass die Korrektheit des „male recombination“-Ergebnisses anhand der Analyse der Deletionsmutanten nicht eindeutig geklärt werden konnte.

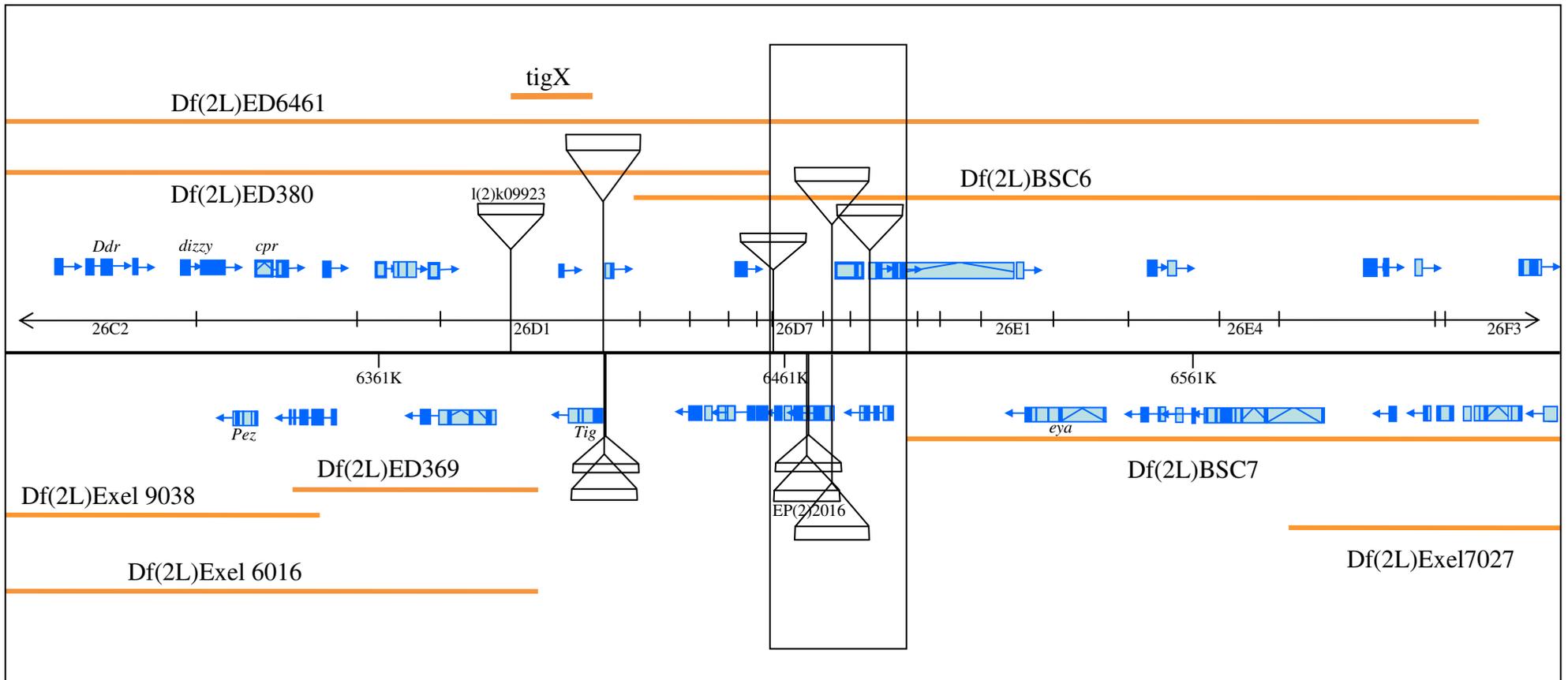


Abb. 8: Die genomische Region um 26D. P- bzw. EP-Elemente, die für bisherige Analysen verwendet wurden, sowie bekannte Gene und die Defizienzen, die für die Komplementationsanalyse verwendet wurden, sind schematisch dargestellt.

3.1.3 Transposonexzisionsmutagenese von DLP^{KG01694}

Von den in der ermittelten Region gelegenen Transkriptionseinheiten war zunächst das Gen *Daxx-like-protein*, abgekürzt *DLP*, der vielversprechendste Kandidat, da für dieses Gen aufgrund seiner Homologie zu dem Säuger-Protein DAXX unter anderem eine Rolle im *Jun*-Kinase-Signaltransduktionsweg angenommen wird. Da Zielgene des *Jun*-Kinase-Signaltransduktionswegs in *mummy*-Mutanten weniger stark exprimiert werden, könnte *mummy* in diesem Signalweg von Bedeutung sein.

Im *Bloomington Stock Center* ist eine P-Elementinsertion, DLP^{KG01694}, erhältlich, die für eine Transposonexzisionsmutagenese genutzt werden sollte. Bei der Mobilisierung von P-Elementen durch TRANSPOSASE kommt es mit variabler Häufigkeit zu unpräzisen Exzisionen, so dass in den angrenzenden genomischen Regionen Deletionsmutationen entstehen (Daniels *et al.*, 1985). Die Wahrscheinlichkeit, auf diese Weise eine Mutante in einem gewünschten Gen zu erzeugen, wächst, je näher das Gen dem Insertionsort des P-Elementes ist. Falls es sich bei *mummy* also um das Gen *DLP* handeln sollte, wäre vermutlich ein relativ kleiner Versuchsansatz zur Erzeugung einer *mummy*-Defizienz ausreichend. Tatsächlich wurden von ca. 80 erzeugten Reversionen des dominanten *w*⁺-Markers drei in Transheterozygose zu dem *mummy*-Allel *mmy*^{H1-20} letale Deletionsmutanten gefunden. Eine genaue Charakterisierung der Mutanten wurde jedoch bisher nicht durchgeführt, da in der Zwischenzeit andere Untersuchungen die Zugehörigkeit *mummys* zu einer anderen Transkriptionseinheit als *DLP* wahrscheinlich machten.

3.1.4 Untersuchung des CG9535 anhand eines sequenzierten Allels

Aufgrund phänotypischer Ähnlichkeiten des ZNS-Phänotyps mit *mummy* wurde ein Gen in die Untersuchungen einbezogen, das von anderen Forschungsgruppen wegen seiner Funktion bei der Entwicklung der Tracheen analysiert worden war. Das entsprechende Gen, *CG9535*, liegt in dem für die *mummy*-Lokalisation ermittelten Bereich und codiert die potentielle *Drosophila* UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE mit zwei möglichen Isoformen (Abb. 9 A). Die von diesem Enzym katalysierte Reaktion ist in Abb. 9 B dargestellt. Das Reaktionsprodukt,

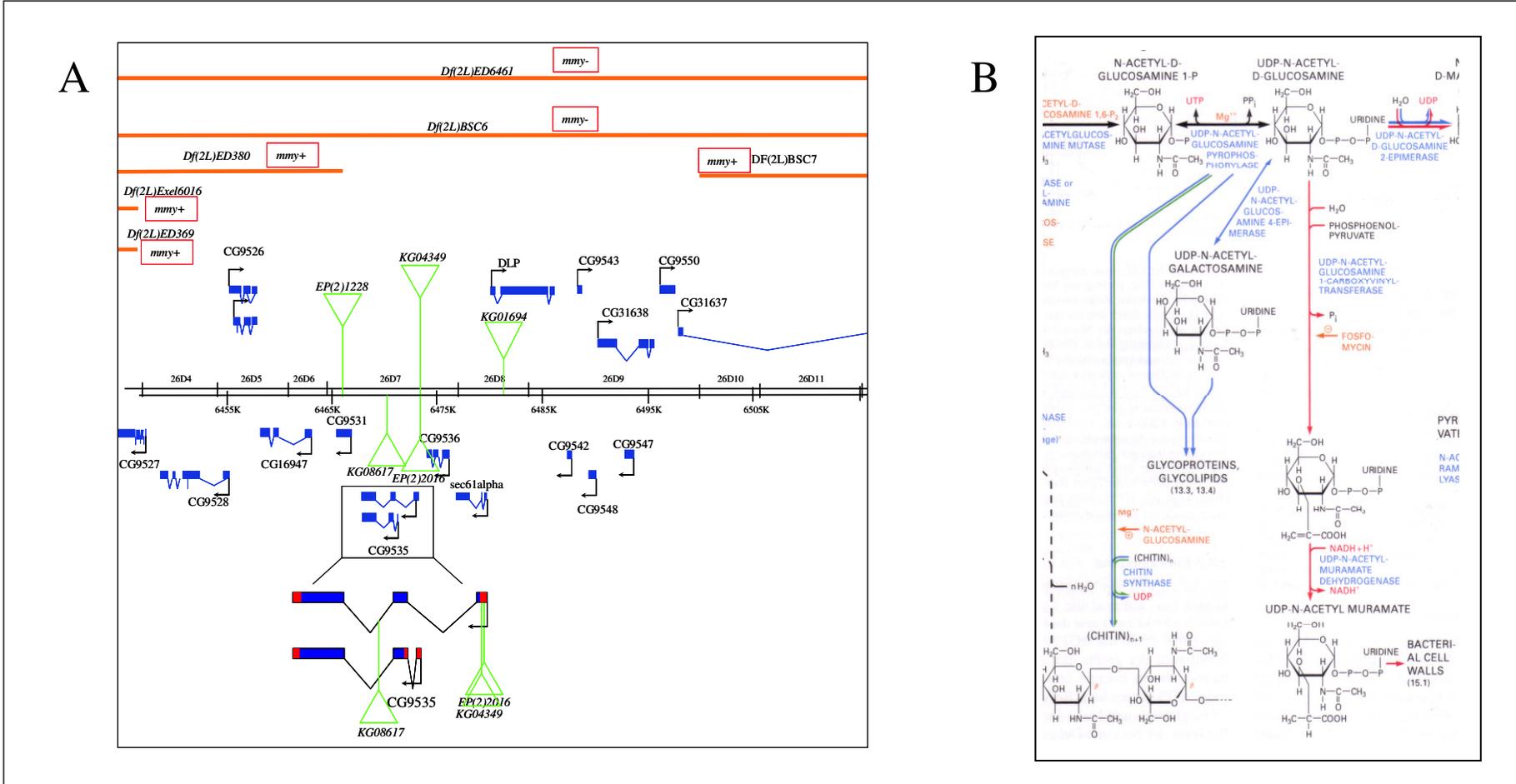


Abb. 9: Darstellung der Transkriptionseinheit *CG9535* und des biochemischen Prozesses in dem die UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE von Bedeutung ist. (A) Die Lage der Deletionen, die den Bereich von *mummy* eingrenzen und einiger *P*-Elemente ist angegeben. Aufgrund des Maßstabes treten einige Ungenauigkeiten bei der Angabe der Genstrukturen auf. (B) Darstellung des biochemischen Prozesses. Die Abb. wurde entnommen aus *Biochemical Pathways*.

UDP-N-Acetylglucosamin findet in vielen biologischen Prozessen Verwendung. Es ist ein Grundbaustein für die Chitinsynthese, für die Glycosylierung von unterschiedlichsten Proteinen und Lipiden und auch für die Synthese von GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Ankern, die zur Verankerung von Proteinen auf der Zellaußenseite dienen. Die Herstellung dieses Moleküls ist also für die Zellen von entscheidender Bedeutung und ein Verlust hat vielfältige Auswirkungen. Eine genetische Interaktion konnte für das *CG9535* mit dem Gen *pannier* gezeigt werden (Pena-Rangel *et al.*, 2002). *pannier* codiert für einen Transkriptionsfaktor, der für den dorsalen Schluss der Epidermis, Zelldifferenzierung und die direkte Aktivierung der proneuralen Clustergene *acheate* (*ac*) und *scute* (*sc*) von Bedeutung ist. Die Überexpression des Gens durch *EP(2)2016*, das nahe des 3'-Endes im Gen inseriert ist, mit *pnrGal4* führte zur Letalität. Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob *mummy* dem *CG9535* entspricht, wurde eine Komplementation verschiedener EMS- und Exzisionsmutanten mit dem sequenzierten *CG9535*-Allel *CG9535^{GA760}* (erhalten von Guy Tear) durchgeführt. In Transheterozygose zu *CG9535^{GA760}* führen alle getesteten *mummy*-Allele zur Letalität. Es konnte demnach gezeigt werden, dass es sich bei *mummy* um das *CG9535* und damit um ein Enzym der UDP-N-Acetylglucosamin-Synthese handelt.

3.1.5 Analyse eines möglichen Einflusses von *mummy* auf die GPI-Anker-Synthese

Das von der UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE gebildete UDP-N-Acetylglucosamin ist unter anderem Grundbaustein für die Synthese von GPI-Ankern. Die Biosynthese von GPI-Ankern lässt sich in zwei Hauptschritte gliedern: (1) Den Zusammenschluss der GPI-Einheit in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und (2) die Übertragung der GPI-Einheit auf das Protein unter Abspaltung einer carboxyterminalen GPI-Signalsequenz. Die strukturelle und funktionelle Diversität der Proteine, die GPI-geankert vorliegen oder eine GPI-geankerte Isoform aufweisen, ist sehr groß und umfasst hydrolytische Enzyme und Adhäsionsproteine ebenso wie regulatorische und Rezeptorproteine. Es ist daher denkbar, den *mummy*-Phänotyp über diese Funktion des UDP-N-Acetylglucosamins mit der Genfunktion zu korrelieren, da

auch für die Entwicklung des ZNS und den dorsalen Schluss der Epidermis GPI-verankerte Proteine zum Einsatz kommen. Um Hinweise auf eine solche Verbindung zu erhalten, wurde ein weiteres essentielles Gen der GPI-Ankersynthese, PIG-T, auf seine Funktion in der ZNS-Entwicklung und dem dorsalen Schluss der Epidermis untersucht. Das Allel *CG11190^{PG11}* zeigte in Homozygose keinen ZNS-Phänotyp. Auch ein Defekt beim dorsalen Schluss konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Der Ort der Biosynthese und der Übertragung des GPI-Ankers auf das entsprechende Protein ist das ER. Das unreife Protein gelangt aufgrund einer amino-terminalen Signalsequenz dorthin und benötigt am carboxy-terminalen Ende eine weitere Signalsequenz zum Anfügen der GPI-Einheit. Die Sequenz dieser Signale ist bei verschiedenen Proteinen unterschiedlich, die Struktur weist jedoch charakteristische Gemeinsamkeiten auf, die für die Funktion der Signalsequenz essentiell sind (Eisenhaber, 1998; Eisenhaber, 1999). Ist der Transfer der GPI-Einheit auf das Protein beendet und ein GPI-Ankerprotein entstanden, wird dieses über Vesikel aus dem ER und zur Zellmembran transportiert. Bei einer Störung der Biosynthese oder Übertragung eines GPI-Ankers bleiben die Proteine im ER „stecken“ (Field *et al.*, 1994). In *mummy*-mutanten Embryonen sollte daher gegebenenfalls die subzelluläre Verteilung normalerweise GPI-verankerter Proteine gestört sein.

Zur Untersuchung des Einflusses von *mummy* auf die GPI-Ankerproduktion wurde ein GFP-Protein eingesetzt, das mit einer GPI-Signalsequenz versehen ist. In einem *mummy*-mutanten Hintergrund wurde das UAS GFP-GPI durch *daGal4* exprimiert. *daGal4* wurde aufgrund der relativ ubiquitären Expression für das Experiment ausgewählt. Es folgte eine Antikörperfärbung mit polyklonalem α -GFP-Antikörper und α -DISCS LARGE-(DLG)-Antikörper, der zur Markierung der Zellmembran eingesetzt wurde. Nach der Färbung wurden die Embryonen auf den dorsal offenen Phänotyp von *mummy* selektioniert und konfokal analysiert. Das Ergebnis des Experimentes ist in Abb. 10 dargestellt. Ein Unterschied in der Verteilung des GFPs konnte nicht beobachtet werden (Abb. 10 A & B). Deutlich sind in der Kontrolle, wie auch in *mmy*-mutanten Embryonen bei Aufsicht auf die Epidermis, die Zellgrenzen zu erkennen. Die Co-Lokalisation mit DISCS LARGE bestätigt die Verteilung des GFPs an der Membran

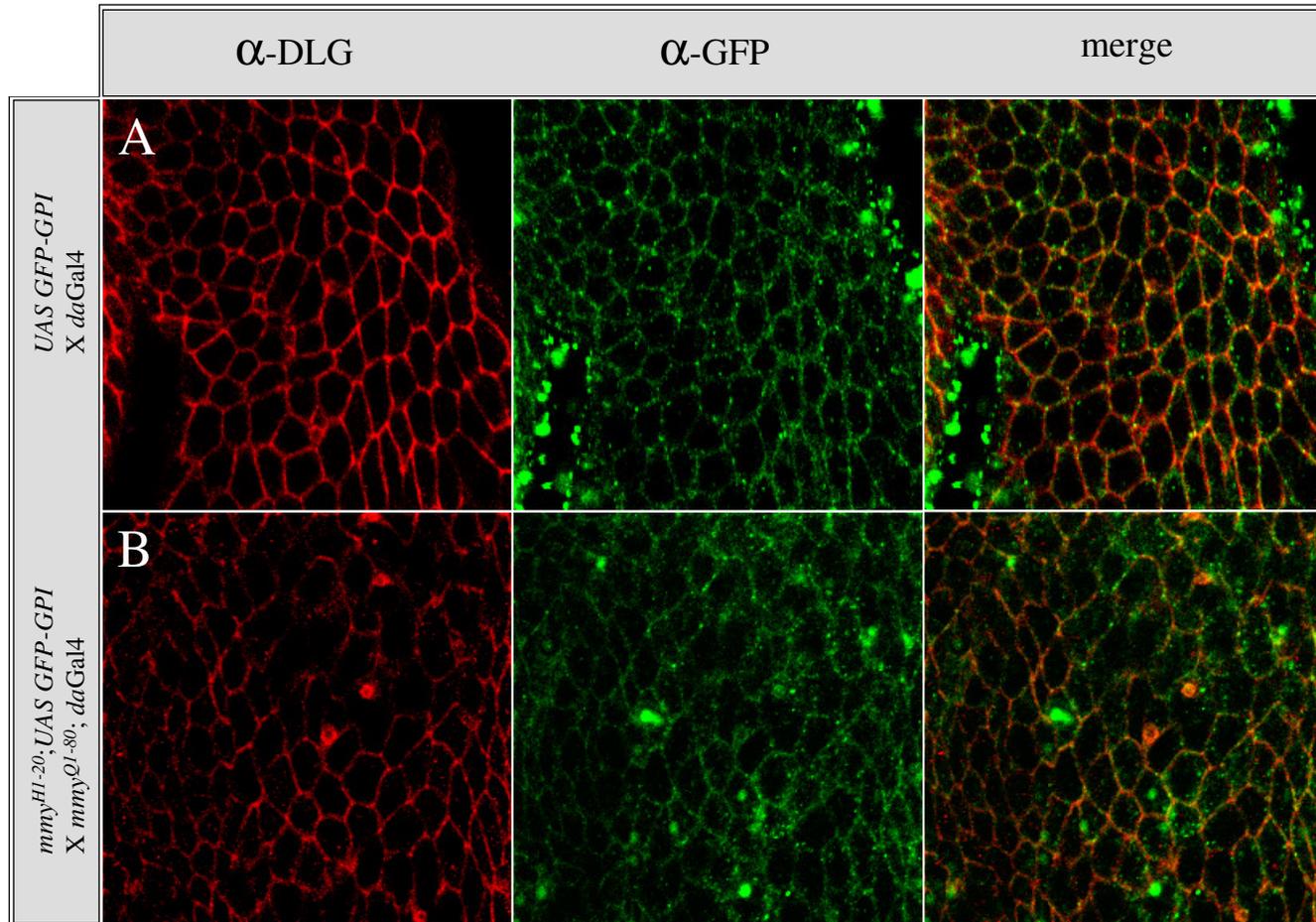


Abb. 10: Konfokale Untersuchung des Effektes von *mummy* auf die Verteilung von GFP-GPI.

Laterale Aufsicht auf die Epidermis von *daGal4/UAS GFP-GPI* (A) und *mmy^{H1-20}/mmy^{Q1-80}; daGal4/UAS GFP-GPI*-Embryonen, Stadium 16 (B), gefärbt mit α -DLG und α -GFP. Die Verteilung des GFP ist in den *mmy*-mutanten Embryonen nicht verändert. Beide Antikörper markieren die Zell-Membranen. Zudem ist in der α -GFP-Färbung eine schwache cytoplasmatische Komponente zu erkennen.

(Abb. 10). Ein Teil des Proteins scheint jedoch auch cytoplasmatisch vorzuliegen. Die punktuelle Verteilung könnte auf eine Lokalisation in Vesikeln hinweisen.

Um einen weiteren Anhaltspunkt für oder gegen den Zusammenhang des *mummy*-Phänotyps mit der Bildung von GPI-Ankern zu erhalten, wurde parallel zu der phänotypischen Analyse ein biochemischer Ansatz gewählt. Embryonen der oben beschriebenen Kreuzung wurden auf das Vorhandensein des *daGal4*-Treibers und des GFP-Proteins selektioniert, lysiert und für eine *Western-Blot*-Analyse eingesetzt. Als Kontrolle wurden Embryonen der oben genannten Kontrollkreuzung verwendet, wobei die Selektion aufgrund der Homozygose beider Faktoren in der Parentalgeneration entfällt. Zur Detektion des GFP-GPI-Proteins wurde der polyklonale α -GFP-Antikörper aus Kaninchen eingesetzt. Der Blot ist in Abb. 11 gezeigt.

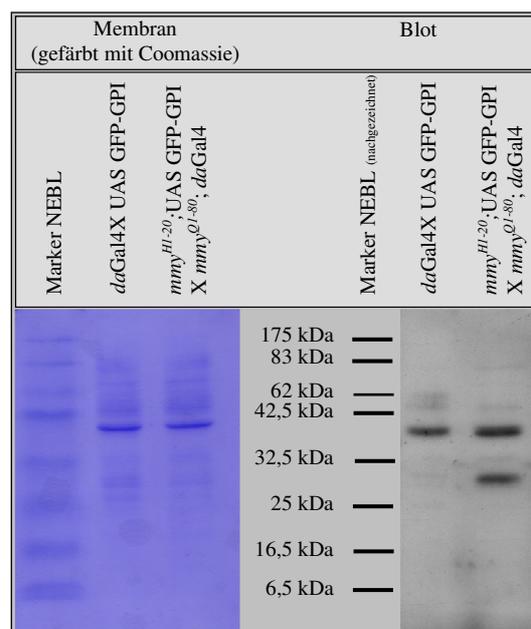


Abb. 11: Western-Blot aus Embryolysaten, inkubiert mit PAB α -GFP-Kaninchen und α -Kaninchen-HRP, sowie anschließender Reaktion mit ECL-System der Firma *Amersham*. Die Coomassie-gefärbte Membran ist links gezeigt, rechts der entwickelte Röntgenfilm. Die Markerbanden wurden anhand der Membran nachgezeichnet.

Das GFP-GPI-Protein lässt sich mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 40 kDa sowohl im Wildtyp als auch im *mummy*-Hintergrund nachweisen. In der Spur, deren

Lysat aus Embryonen der Kontrollkreuzung gewonnen wurde, zeigt sich oberhalb der deutlichen Bande ein schwacher Schatten, der aufgrund seiner Breite aus möglicherweise zwei schwach detektierten Banden bestehen könnte, die auf einer Höhe von 50 kDa bzw. 60 kDa laufen. In der Spur, deren Embryonenlysate zu einem Viertel aus homozygot mutanten *mummy*-Tieren gewonnen wurde, ist oberhalb der bereits beschriebenen Bande ebenfalls eine schwach detektierende Bande zu erkennen. Sie ist bedeutend schmäler als die undeutliche Bande in der Kontrollspur und ist daher wohl eine Einzelbande, deren Laufhöhe in etwa einer Proteingröße von 50 kDa entspricht. Besonders prominent ist in dieser Spur aber eine Bande mit einer Laufhöhe von etwa 29 kDa. Da die beschriebene Proteingröße von GFP mit 27 kDa angegeben ist (Davis *et al.*, 1995), könnte es sich bei dieser Bande um das Protein ohne den angehängten Membrananker handeln. Zumindest unterscheiden sich die beiden Spuren in dem vom Antikörper detektierten Bandenmuster deutlich voneinander und es ist daher anzunehmen, dass sich der Verlust der *mummy*-Funktion auf die Größe des GFP-GPI-Proteins auswirkt. Eine Funktion von *mummy* bei der GPI-Ankersynthese bleibt daher denkbar.

Eine Untersuchung von FASCICLIN II (FASII), einem Protein, das zum Teil ebenfalls GPI-verankert sein soll (Wright and Copenhaver, 2000), wurde beispielshalber vorgenommen. Die *Western-Blot*-Analyse von Proteinextrakten heterozygoter *mmy*^{HI-20}, *mmy*^{A2016-3} und *PG111*-Embryonen zeigte keine Veränderung der Proteingröße von FASII (Abb. 12).

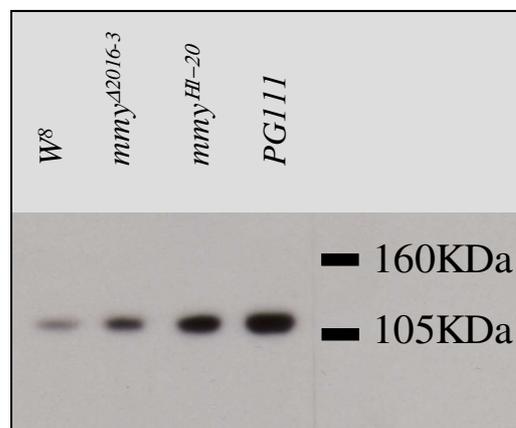


Abb. 12: *Western Blot*-Analyse heterozygoter *mummy*-Allele und *PG111* aus Embryonenlysaten, detektiert mit α -FASII und α -Maus-HRP, sowie anschließender Reaktion mit dem *Western Blot detection reagent* der Firma Amersham.

Ein Einfluss von *mummy* auf die Produktion der GPI-Anker ist nach den bisherigen Versuchen denkbar, es ist jedoch zu vermuten, dass die Produktion teilweise unabhängig von *mummy* verläuft oder eine mögliche maternale Komponente die Ergebnisse relevant beeinflusst.

3.1.6 Analyse des Einflusses von *mummy* auf die Glycosylierung

Glycosylierung ist ein posttranslationaler Prozess, der die Funktionalität vieler Proteine wesentlich beeinflusst. Als Grundbaustein wird auch hier das UDP-N-Acetylglucosamin verwendet, so dass eine Funktion *mummys* in diesem Prozess ebenfalls untersucht werden sollte. Die zur *Western-Blot*-Analyse verwendeten Proben entsprachen denen des vorhergegangenen Versuchs. Das Glyco-Protein FASIII wurde stellvertretend für den Prozess der Glycosylierung verwendet und im α -FASIII detektiert.

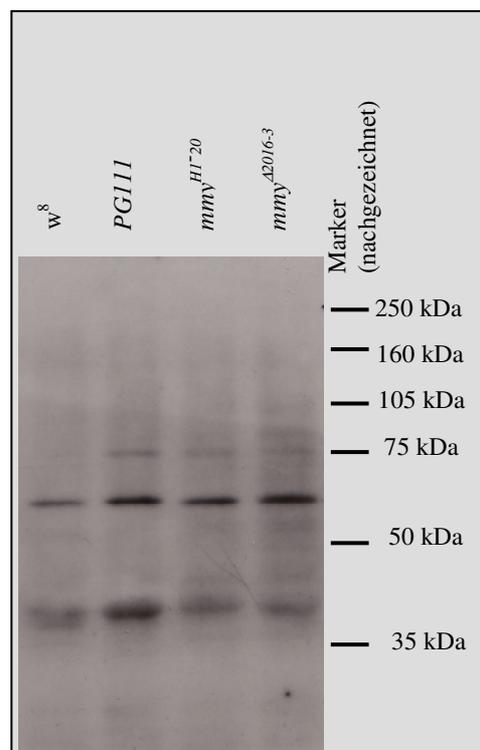


Abb. 13: *Western blot*-Analyse heterozygoter *mummy*-Allele und *PG111* aus Embryonenlysaten, detektiert mit α -FASIII und α -Maus-HRP, sowie anschließender Reaktion mit dem *Western Blot detection reagent* der Firma Amersham

Die Spuren, deren Embryonenlysat zu 25 % aus *mummy*-mutanten Embryonen bestand, wiesen neben der auf 55 kDa detektierten Bande in allen Spuren eine deutliche zusätzliche Bande bei 75 kDa auf. Darüber hinaus konnten einige schwächere, größere Banden detektiert werden, die ebenfalls in der Wildtyp-Spur nicht erkennbar waren. Die Änderung der Proteingröße lässt auf eine Funktion von *mummy* bei der Glycosylierung schließen.

3.2 Untersuchungen zum Gen *kette*

3.2.1 Funktionelle Analyse in adulten Geweben

Um das Gen *kette*, in dem Mutationen in Homozygose embryonal zur Letalität führen, auch auf seine Funktion in adulten Geweben untersuchen zu können, kann die FRT/FLP-Technik verwendet werden (Golic, 1991; Xu und Rubin, 1993). Mit Hilfe dieser Technik wird mit hoher Effizienz mitotische Rekombination erzeugt, so dass in einem für die zu untersuchende Mutation heterozygoten Tier homozygot mutante Bereiche erzeugt werden, die auf die Auswirkungen des Verlustes der Genfunktion untersucht werden können. Eine Voraussetzung für die Verwendung des Systems ist ein Fliegenstamm, der zwischen dem Centromer und dem zu untersuchenden Gen die sogenannte FRT-Sequenz trägt. Da für das Gen *kette* ein solches Chromosom noch nicht zur Verfügung stand, sollte zunächst ein solches generiert werden. Die Lage des Gens bei 79 E-F, also in räumlicher Nähe zum Centromer erschwert jedoch die Herstellung, da die üblicherweise verwendete Methode der klassischen Rekombination aus zwei Gründen nicht erfolversprechend ist. Zum einen ist die Rekombinationsrate nahe des Centromers ohnehin sehr niedrig, zum anderen liegt das einzig verwendbare bei Bloomington erhältliche FRT bei 80B, so dass ein Rekombinationsereignis zwischen *kette* und diesem FRT statistisch gesehen die Ausnahme bedeutet (Wahrscheinlichkeit < 0,01 %). Es musste daher nach Alternativen für die Generierung des benötigten *kette*-FRT-Chromosoms gesucht werden.

3.2.1.1 Generierung des *kette*-FRT-Chromosoms durch EMS-Mutagenese

Wenn durch Rekombination kein bereits vorhandenes Allel mit dem FRT gekoppelt werden kann, ist die Erzeugung eines neuen Allels auf dem FRT-Chromosom eine Möglichkeit. Das Kreuzungsschema ist im Teil *Material & Methoden* Absatz 2.2.1.7 dargestellt. Kreuzungen, die nur *Tubby*-Puppen enthielten oder in denen nur *Tubby*-Puppen schlüpfen, wurden gegen weitere *kette*-Allele komplementiert. Insgesamt wurden acht Screenrunden durchgeführt. Von den 8793 angegangenen, gescreenten Kreuzungen erwiesen sich in der ersten Testkreuzung insgesamt 82 als letal gegen *kette*^{C3-20} oder *kette*^{J4-48}, was einer Quote von 0,93% entspricht. Diese große Anzahl ließ

bereits vermuten, dass die für die Testkreuzung verwendeten EMS-induzierten *kette*-Allele möglicherweise letale „background hits“ tragen. Die Tatsache, dass alle getesteten 56 „Positiven“ über jeweils anderen *kette*-Allelen lebensfähig waren, bestätigte diese Vermutung. Die Komplementationsanalysen der übrigen 26 gefundenen Chromosomen mit den jeweils anderen *kette*-Allelen konnten nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden Kreuzungen aus verschiedenen Gründen „nicht angegangen“ waren und eine Wiederholung aufgrund der wenigen Ausgangstiere nicht möglich oder ebenfalls nicht erfolgreich war. Um eine generelle Vorstellung der Letalitätsrate zu bekommen, wurde eine Testrunde durchgeführt, die zeigte, dass bei einem Einsatz von 25mM EMS 56,7 % der geselbsteten Testkreuzungen letal waren, was eine generelle Funktionalität des Systems bestätigte. Aufgrund der in Bezug auf die Erzeugung neuer *kette*-Allele negativen Screenergebnisse, wurde die EMS-Konzentration in einzelnen Screenrunden jedoch auf bis zu 35 mM EMS erhöht.

3.2.1.2 Generierung des *kette*-FRT-Chromosoms durch „male recombination“

Da sich die Erzeugung eines *kette*-FRT-Chromosoms mit Hilfe der EMS-Mutagenese als schwieriger herausstellte als zunächst angenommen worden war, wurde parallel zu der achten Screenrunde ein Alternativansatz gewählt. Wie bereits beschrieben kann es bei Männchen, die eine Transposasequelle und eine P- bzw. EP-Elementinsertion tragen, zu einem Rekombinationsereignis in naher Umgebung des P-Elementes kommen. Auf diese Weise kann zwischen nah beieinander liegenden Faktoren ein Rekombinationsereignis herbeigeführt werden. Für die Generierung des *kette*-FRT-Chromosoms durch „male recombination“ waren daher die Transposoneigenschaften des FRTs entscheidend. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass durch diese Methode auch Veränderungen wie Deletionen im Bereich des Transposons auftreten können (Preston und Engels, 1996). Das Kreuzungsschema ist in *Material & Methoden* 2.2.1.8. dargestellt. Eine Vorselektion auf Rekombinationsereignisse konnte anhand des fehlenden *ebony*-Markers vorgenommen werden, den das ursprüngliche *kette*^{J4-48}-Allel trägt. Erst danach erfolgte eine Kontrolle gegen andere *kette*-Allele, wie *kette*^{G1-37}, *kette*^{J1-70} und *kette*⁰³³³⁵, sowie gegen einen *eyFLP*; FRT80BM-Stamm zur Überprüfung

der Anwesenheit der FRT-Sequenz. Aus insgesamt 931 gesichteten Kreuzungen konnten zwei, M_3 und A_2 genannt, isoliert werden, die andere *kette*-Allele nicht komplementierten. Der Test auf Anwesenheit der FRT-Sequenz zeigte jedoch nur für A_2 ein positives Ergebnis. Der Versuch, auch die Allele *kette*^{G1-37} und *kette*^{J1-70} auf diese Weise mit einer FRT-Sequenz zu versehen, wurde aus Zeitgründen nach gescreenten 269 bzw. 296 Kreuzungen beendet.

3.2.1.3 Klonale Analyse der *kette*-Funktion im Auge

Die erhaltenen *kette*^{J4-48}-FRT-Fliegen wurden, wie bereits erwähnt, gegen *eyFLP*; FRT80B *M*-Fliegen gekreuzt um die Funktionalität der FRT-Sequenz zu testen. Das FRT80B-Chromosom des *Flipase*-Stammes trägt zusätzlich *Minute (M)*, das dem durch die Rekombination entstehenden „Wildtyp“-Klon einen Wachstumsnachteil verschafft. Auf diese Weise sollte der entstehende *kette* mutante Klon an Größe zunehmen. Im adulten Auge ist der *kette*-Klon zusätzlich durch w^- markiert. Die erhaltenen genotypisch korrekten Nachkommen zeigten stark verkleinerte, raue Augen (Abb. 15 G). Es konnten jedoch keine w^- - Bereiche im Auge gesehen werden. Zur genaueren Untersuchung wurde eine Kreuzung gegen die Stämme *hsFLP*; *armlacZ* FRT80B und *hsFLP*; *ubiGFP* FRT80B vorgenommen. Durch einen Hitzeschock im ersten bis zweiten Larvenstadium kann die Klongröße variiert werden und mit Hilfe von Antikörperfärbungen gegen β -GALACTOSIDASE, GFP oder MYC können die Klone in präparierten Augenimaginalscheiben sichtbar gemacht werden. Da die verwendeten Stämme kein *Minute* tragen, überleben beide Klonteile als so genannte „Zwillingsflecken“. Nachdem ein Hitzeschock im Larvenstadium 1-2 gegeben worden war, wurden die im dritten Larvenstadium präparierten Augenimaginalscheiben mit den Antikörpern α - β -GALACTOSIDASE und α -GFP mit anschließender Fluoreszenzfärbung gefärbt. Die „wildtypischen“ Klone sind an der stärkeren α - β -GALACTOSIDASE- Färbung leicht zu erkennen. Es lassen sich jedoch keine Bereiche ausmachen, die keine α - β -GALACTOSIDASE- Färbung aufweisen und damit homozygot für *kette* sind (Abb. 15 A & C). Der gleiche Effekt lässt sich auch bei Färbungen mit α -GFP beobachten (Daten nicht gezeigt). Entwickeln sich solche Fliegen bis zur Imago,

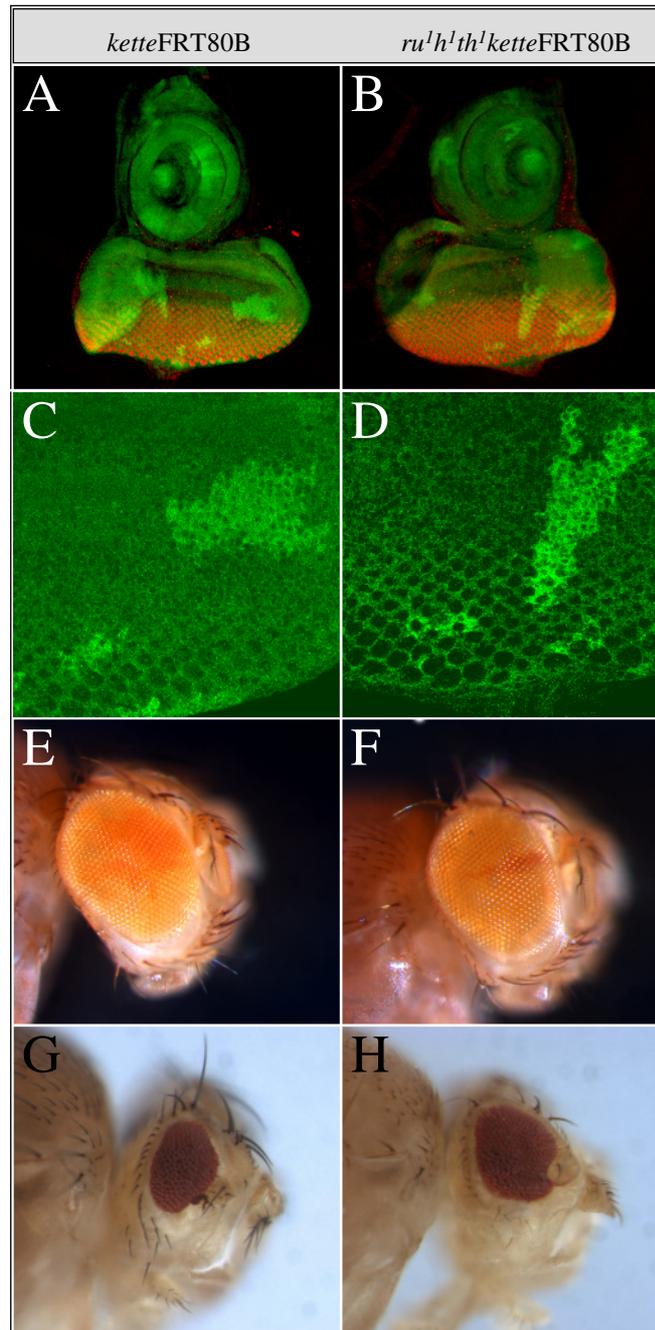


Abb. 14: Klonale Analyse unter Verwendung des *kette*-FRT-Chromosoms und Überprüfung des Effektes durch Reinigung des Chromosoms.

(A-D) Präparationen von Augenimaginalscheiben des 3. Larvenstadiums, anterior ist oben. Antikörperfärbungen mit den mAB α -ELAV-Maus und pAB α - β -GALACTOSIDASE-Kaninchen. Der α -ELAV färbt die differenzierten Photorezeptorzellen und die Expression des *armlacZ*-Markers wurde mit α - β -GALACTOSIDASE sichtbar gemacht. (E-H) Ansicht adulter Augen, anterior ist rechts. (A, C, E, G) Bei Verwendung des ungereinigten *kette*FRT-Chromosoms ist kein homozygot *kette*-mutantes Gewebe erkennbar. (B, D, F, G) Die Reinigung des Chromosoms ergibt keine Veränderung des Phänotyps. Die Abbildungen A und B, E-H sind Projektionen, C und D *single sections*.

erkennt man in den adulten Augen ein ähnliches Muster (Abb. 15 E): Kräftiger und heller gefärbte Bereiche, die auf die Markierung des *armlacZ FRT80B* bzw. *ubiGFP FRT80B* zurückzuführen sind und die homozygoten und heterozygoten Bereiche anzeigen, aber keine weißen Bereiche, die eine homozygot *kette*-mutante Situation anzeigen würden (Daten für *hsFLP; armlacZ FRT80B* nicht gezeigt). Es war demnach als wahrscheinlich anzusehen, dass die homozygot *kette*-mutanten Zellen während der frühen Augenentwicklung sterben, so dass sie weder in den Augen-Antennen-Imaginalscheiben noch im adulten Auge nachweisbar sind.

Mit dem Auftreten der „wildtypischen“ Bereiche war jedoch die Anwesenheit und Funktionalität der FRT-Site bewiesen. Dennoch blieb zu klären, ob der beobachtete Effekt wirklich auf den Ausfall der *kette*-Genfunktion zurückzuführen ist. Zum einen könnten die schon in den vorherigen Versuchen beschriebenen weiteren „letalen hits“ in dieser Beziehung von Bedeutung sein, da für die „male recombination“ ein ungereinigtes EMS-Allel verwendet worden war. Zum anderen könnte die „male recombination“ eine Veränderung, wie zum Beispiel eine Deletion induziert haben, die Auswirkungen auf das Überleben der Zellen hat. Um herauszufinden, ob der Verlust von *kette* für den Tod des klonalen Gewebes verantwortlich ist, wurde zunächst eine Reinigung des Chromosoms durch Rekombination mit einem *rucuca*-Chromosom und anschließender Selektion gegen ein *ruPrica*-Chromosom durchgeführt. Dabei wurde besonderen Wert auf den linken Arm des Chromosoms gelegt, da der rechte Arm durch die „male recombination“ ohnehin ausgetauscht war und keine „letalen hits“ der EMS-Mutagenese mehr enthalten konnte. Die entsprechenden Fliegen wurden zum Test auf Letalität gegen *kette* zurückgekreuzt und zur Kontrolle der FRT-Site gegen den *eyFLP; FRT80B M*-Stamm ausgekreuzt. Es stellte sich heraus, dass die Effekte vor und nach der Reinigung des Chromosoms übereinstimmten (Abb. 15 H). Auch weitere Tests mit *hsFLP* zeigten das gleiche Ergebnis. Weder in den Färbungen der Augen-Antennen-Imaginalscheiben, noch an den Augen der adulten Tiere war eine Abweichung vom zuvor beschriebenen Phänotyp erkennbar (Abb. 15 B, D, F). Diese Daten deuten darauf hin, dass der beschriebene letale Effekt tatsächlich auf den Verlust der *kette*-Genfunktion zurückzuführen sein könnte.

3.2.1.4 Rettung des *kette*-FRT-Phänotyps im Auge

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob der Tod des klonalen Gewebes de facto auf den *kette*-Ausfall zurückzuführen ist, wurde ein UAS-*kette*-Konstrukt in den Hintergrund gekreuzt, das durch die Treiber *armGal4* und *eyGal4* im Auge aktiviert wurde. Wenn der *kette*-Funktionsverlust für den letalen Effekt verantwortlich wäre, sollte die Expression von *kette* eine Rettung des Defektes bewirken. Das Experiment wurde sowohl mit dem gereinigten als auch mit dem ungereinigten *kette*-FRT-Chromosom für beide Treiber durchgeführt. In allen Fällen konnte jedoch kein homozygot *kette*-mutantes Gewebe nachgewiesen werden (vergl. Abb. 15 A & B, Abb. 16). Es war vielmehr keine Veränderung zu den Augenimaginalscheiben der vorherigen Experimente zu erkennen. Es ist demzufolge als fraglich anzusehen, ob der beschriebene Verlust des klonalen *kette*-Gewebes tatsächlich auf den Funktionsausfall von *kette* zurückzuführen ist, oder vielmehr seine Ursache in anderen Letalfaktoren auf dem verwendeten *kette*-Chromosom hat. Die Klärung dieses Sachverhaltes steht noch aus.

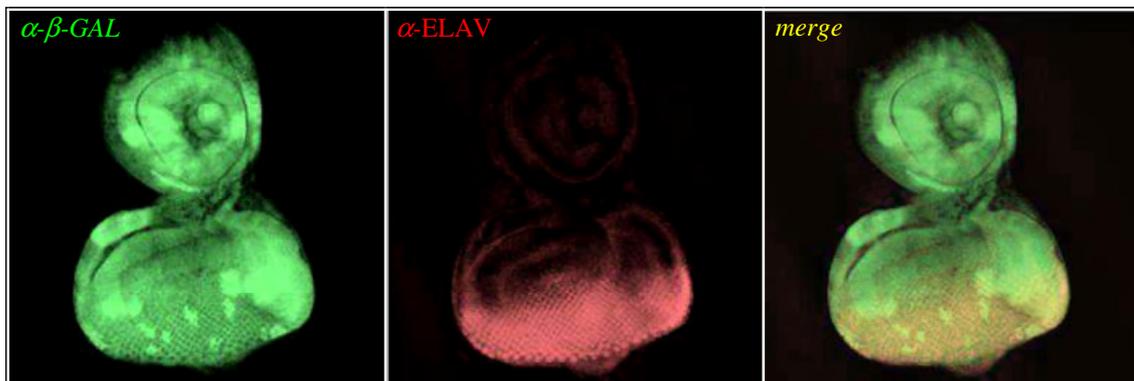


Abb. 16: Augenimaginalscheibe des Genotyps *hsFLP*; UAS *kettelarmGal4*; *armlacZ FRT80B/kette*¹⁴⁻⁴⁸ *FRT80B*, gefärbt mit PAB α - β -GAL und MAB α -ELAV. Homozygot-mutantes Gewebe ist nicht zu erkennen, während das homozygot „wildtypische“ Gewebe an der stärkeren Expression des *armlacZ*-Markers deutlich zu erkennen ist.

3.2.1.5 Erstellung eines *kette*-RNAi-Konstruktes

Um weitergehende Untersuchungen zum Ausfall einer Genfunktion zu machen, ist ein RNAi-Konstrukt von Vorteil, das durch die Wahl geeigneter Primer in beliebigen Geweben die Herstellung des Proteins verhindert. Als Alternative zum *kette*-FRT

wurde daher ein *kette*-RNAi-Konstrukt nach dem folgenden Schema kloniert (Abb. 17). Ein 400bp großes *kette*-Fragment wurde mit Hilfe einer PCR hergestellt, deren Primer die zusätzlichen *XbaI*-Schnittstellen enthielten (Sequenzen siehe Anhang V). Aufgrund der Kompatibilität der *XbaI* und *AvrII*-Restriktionsstellen konnte das *kette*-Fragment zweimal in den Vektor eingefügt werden und durch eine PCR wurde die Richtung der beiden Fragmente ermittelt. Anschließend wurde eine Keimbahntransformation durchgeführt (M & M 2.2.1.11). Insgesamt konnten 10 Stämme etabliert werden, deren Insertionen auf dem zweiten und dritten Chromosom lagen (siehe Anhang VI). Es wurden keine Insertionen auf dem X- oder dem vierten Chromosom erhalten.

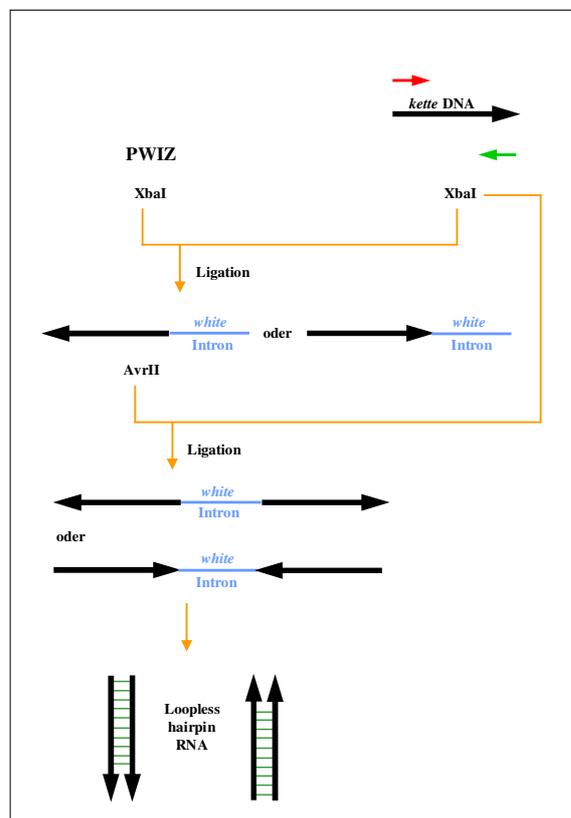


Abb. 17: Schematische Darstellung des Klonierungsprinzips unter Verwendung des PWIZ-Vektors (modifiziert nach Lee, Y. S. and Carthew, R. W. (2003)).

3.2.1.6 Untersuchung des *kette*RNAi-Effektes auf verschiedene Gewebe

Für den KETTE/ABI/SRA-1-Proteinkomplex wurde bereits eine Rolle bei der Regulation des AKTIN-Zytoskeletts nachgewiesen (Eden *et al.*, 2002), die anhand des Effektes des exprimierten *kette*RNAi-Konstruktes auf die mechanosensorischen Borsten untersucht werden sollte. Als Treiber wurde *scaGal4* verwendet, der die Expression im *proneuralen cluster* und damit in allen *sensory organ precursor*-Zellen (*SOPs*) steuert. Die Expression einer Kopie des Konstruktes mit Hilfe einer Kopie des Treibers führte zu keinem Effekt auf die Borstenentwicklung. Auch ein Temperaturshift von 25 °C auf 29 °C zeigte keine Auswirkungen, ebenso wie eine Erhöhung der Kopienzahl des Konstruktes. Erst bei Erhöhung der Kopienzahl des Treibers konnte ein Effekt beobachtet werden. Viele Makrochaeten auf Kopf und Thorax waren verschwunden (Abb. 19). Zudem waren die verbliebenen Makrochaeten teilweise dünner und erheblich kürzer. Da der Treiber in Homozygose bei 25 °C jedoch ohne jegliches Konstrukt ebenfalls einen Phänotyp aufweist (Daten nicht gezeigt), wurde das Ergebnis anhand einer Auszählung von je 30 Tieren quantifiziert. Im folgenden Diagramm sind die Ergebnisse der Auszählung dargestellt (Abb. 18).

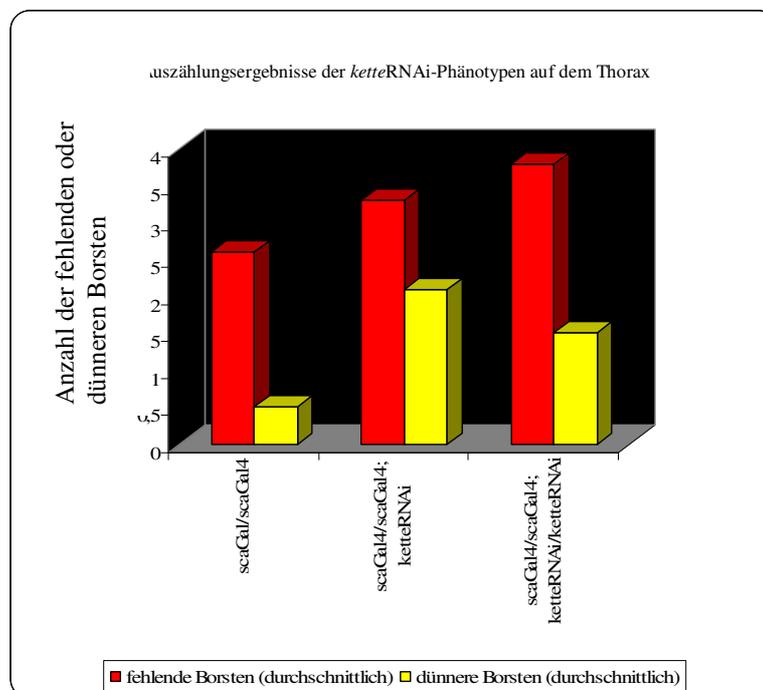


Abb. 18: Quantifizierung der *kette*RNAi-Phänotypen auf 25 °C. Es sind sowohl fehlende als auch dünnere Borsten angegeben, wobei von den ausgezählten Tieren ein Durchschnittswert gebildet wurde.

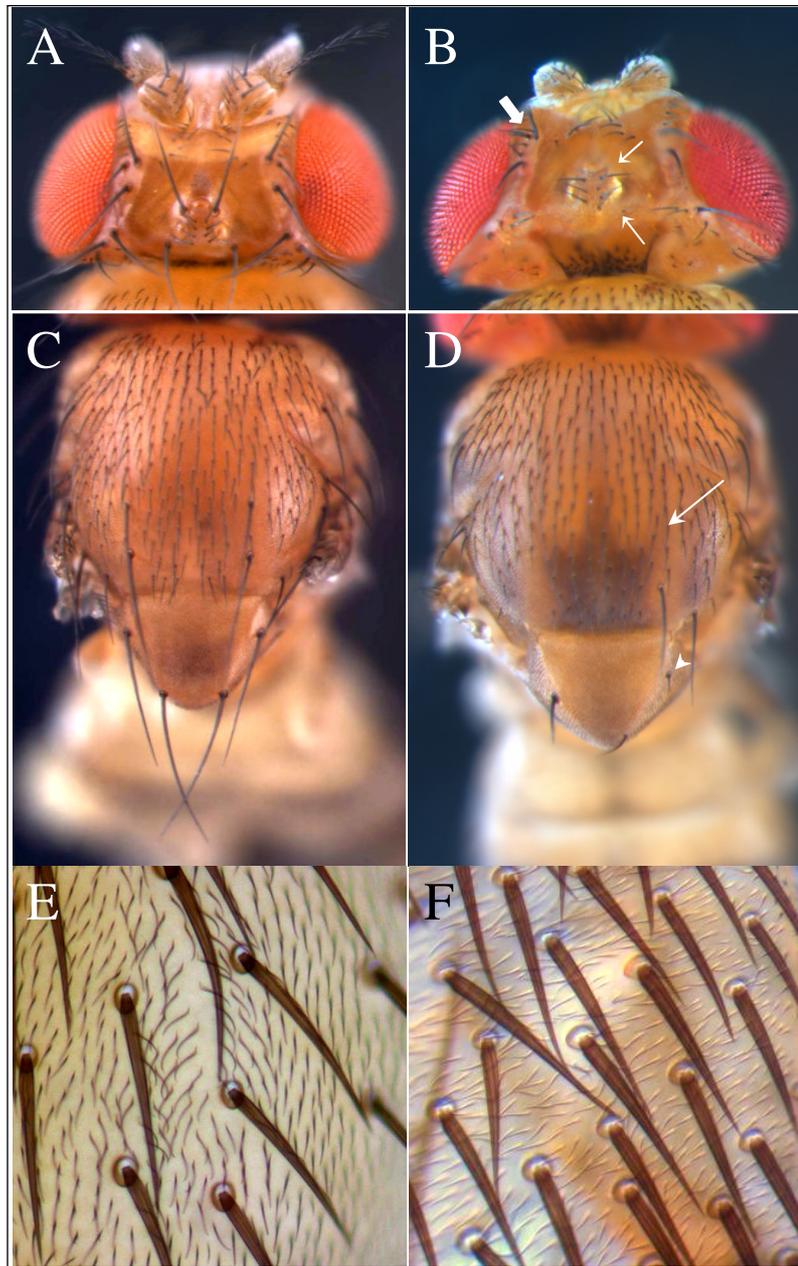


Abb. 18: Ausprägungen des *kette*RNAi-Phänotyps in verschiedenen Geweben bei 29 °C. (A, C, E) Wildtyp. (B, D, F) Fliegen des Genotyps *scaGal4/scaGal4; ketteRNAi 3-1/3-1*. Alle Abbildungen sind Projektionen. (A, B, C, D) Die Anzahl der Makrochaeten auf Kopf und Thorax ist stark reduziert (Pfeile). (B) Der dicke Pfeil zeigt eine Borste mit morphologischer Veränderung, die Borste ist gespalten. (D) Der Pfeilkopf weist auf eine sehr dünne, kurze Borste hin. (E, F) Präparation der thorakalen Mikrochaeten in Hoyers Medium/Milchsäure 1:1. Morphologische Veränderungen konnten nicht beobachtet werden.

Die Tabelle mit den Auszählungsergebnissen ist im Anhang VII einzusehen. Eine Verstärkung des Effektes durch Erhöhung der Kopienzahl des *kette*RNAi-Konstruktes konnte nur bedingt erreicht werden. Zwar war die Anzahl der fehlenden Borsten etwas erhöht, jedoch war dafür die Anzahl der dünneren, kürzeren Borsten niedriger. Die Entwicklung der Mikrochaeten scheint nicht beeinflusst zu werden, da keine Veränderungen der Anzahl oder Morphologie beobachtet werden konnten (Abb. 19). Um Aufschluss darüber zu erlangen, wie stark die Expression des Konstruktes die Proteinmenge von KETTE beeinflusst, wurden Proteinproben aus Embryonen, Larven und Fliegen gewonnen und anhand einer *Western Blot*-Analyse untersucht. Für diesen Versuch wurden Treiber verwendet, die ein ubiquitäreres Expressionsmuster zeigen als *scaGal4*, *daGal4* für die Embryonen und *armGal4* für die Larven und Fliegen. Weder in Embryonen noch in Larven konnte ein eindeutiger Effekt des Konstruktes auf die Menge des vorhandenen KETTE-Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der deutlichste Effekt zeigte sich bei den Proteinlysaten, die aus Fliegen gewonnen wurden (Abb. 20).

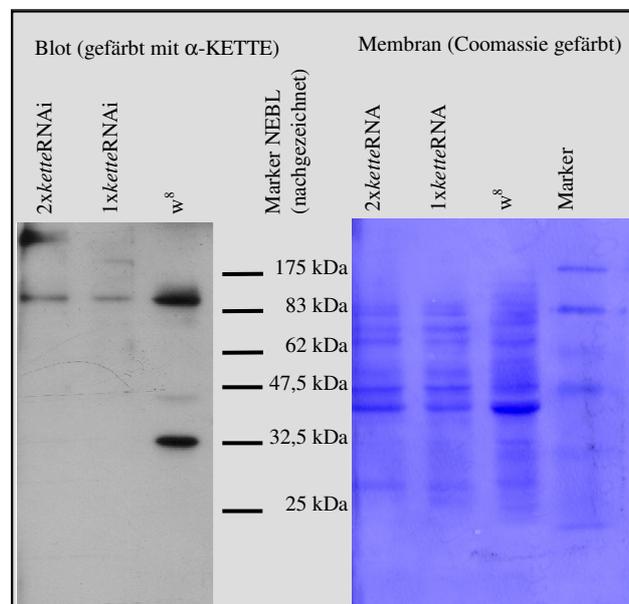


Abb. 20: Western Blot aus Fliegenlysaten, inkubiert mit pAB α-KETTE-Kaninchen und α-Kaninchen-HRP, sowie anschließender Reaktion mit dem *Western Blot detection reagent* der Firma Amersham. Die Coomassie-gefärbte Membran ist links gezeigt, rechts der entwickelte Röntgenfilm. Die Markerbanden wurden anhand der Membran nachgezeichnet.

Im *Western Blot* konnte der Rückgang der Proteinmenge in den *kette*RNAi-Lysaten detektiert werden (Abb. 20). Die Färbung der Membran mit Coomassie ergab jedoch auch eine geringfügig größere Menge an aufgetragenem Protein in der *wt*^{*OregonR*}-Spur (Abb. 20). Deutlich ist jedoch auch die Beeinflussung verschiedener Proteinmengen durch die Expression des Konstruktes, da sich Teile des Bandenmusters in der Ausprägung verändert haben (Abb. 20).

Die geringfügig unterschiedliche Menge an aufgetragenem Protein rechtfertigt nicht den im *Western Blot* detektierten Unterschied in der Menge des *KETTE*-Proteins, so dass von einer Funktionalität des Konstruktes ausgegangen werden kann.

3.2.2 Suche nach Interaktionspartnern auf genetischer Basis

Obwohl bereits einige Interaktionspartner von *KETTE* bekannt waren (Eden *et al.*, 2002) und ein Hauptaugenmerk diesen Proteinen und ihrem Zusammenspiel mit *KETTE* galt, blieb zu vermuten, dass es weitere Interaktionspartner gibt, die noch nicht beschrieben wurden. Ein Teil dieser Arbeit wurde der Suche nach Interaktionspartnern auf der Grundlage genetischer Experimente gewidmet.

3.2.2.1 Beeinflussung des *kette*-Escaper-Phänotyps durch Deletionen und *P*-Element-Insertionen

Im Rahmen eines *Hefe-2-Hybrid*-Experimentes (*yeast-2-hybrid/Y2H*) waren Proteine identifiziert worden, die als mögliche Interaktionspartner von *KETTE* in Frage kamen (persönliche Kommunikation mit Dr. Sven Bogdan). Um den Nachweis der Interaktion *in vivo* zu erbringen, wurden Deletionsmutanten und *P*-Element-Insertionen der zugehörigen Gene auf ihren Einfluss bezüglich des Phänotyps der hypomorphen *kette*-Allele untersucht. Das *kette*-Allel *kette*^{*Δ2-6*} führt in Transheterozygose mit allen isolierten *kette*-Allelen zu *Escapern*, adult lebensfähigen Fliegen mit rauen Augen, zusätzlichen Flügelvenen und gewellten und geknickten Borsten auf Kopf und Thorax. Der Phänotyp der *Escaper* ist in der Ausprägung sehr variabel und nicht alle Fliegen zeigen die sämtlichen Effekte. In Transheterozygose mit dem schwachen *kette*-Allel *kette*^{*J1-70*} treten verhältnismäßig viele *Escaper* auf (Hummel, 1998), die Ausprägung

des Phänotyps ist jedoch besonders in Bezug auf die gestörte Morphologie im Auge eher schwach. Beide Faktoren waren Gründe, die Interaktionsstudien mit dem Allel *kette*^{J1-70} durchzuführen, da Effekte in beide Richtungen deutlich erkennbar sein sollten und vor allem eine genügend große Anzahl der *Escaper* schlüpfen würde, um trotz der Variabilität des Phänotyps eine Aussage treffen zu können.

Da die auf genetische Interaktion zu untersuchenden Gene teilweise auf dem dritten Chromosom liegen, mussten Rekombinanten mit den *kette*-Allelen *kette*^{J1-70} oder *kette*^{A2-6} erstellt werden. Die Tiere wurden dann gegen das jeweils andere Allel ausgekreuzt. Für die Deletionsmutanten, respektive die *P*-Elemente auf den anderen Chromosomen, wurden Stämme etabliert, die eines der beiden *kette*-Allele im Hintergrund trugen. Die Tabelle mit allen getesteten Defizienzen und *P*-Elementen ist im Anhang VIII aufgeführt.

Eine Veränderung des *Escaper*-Phänotyps konnte nur für ein *P*-Element, *Sc2*⁰⁵⁶³⁴, nachgewiesen werden. Das *P*-Element zeigte eine Abweichung des Augenphänotyps. Die Augen reflektierten das Licht auf andere Weise. Solche Reflektionen können das Ergebnis einer morphologischen Störung sein, die den gleichmäßig strukturierten Aufbau des Komplexauges betrifft (Abb. 21). Daher kann dies als eine Verstärkung des Augenphänotyps angesehen werden. Auch der Flügelphänotyp ließ eine Verstärkung erkennen. Es traten häufiger als bei den *Escapern* ohne *P*-Element zusätzliche Flügelvenen auf, besonders an der hinteren Quervene (Daten nicht gezeigt). Ein Effekt auf die Borstenmorphologie konnte nicht beobachtet werden. Insgesamt war der Phänotyp der *Escaper* deutlich verstärkt.

Der in der *Hefe-2-Hybrid*-Analyse gefundene putative Interaktionspartner ist das Gen *Sc2*, das cytologisch in die Region 63F5-6 kartiert wurde und eine Interaktion mit *Krüppel* (*Kr*) aufweist (Carrera *et al.*, 1998). Die Defizienz *Df(3L)GN19*, die dieses Gen aufgrund ihrer in der *Flybase* angegebenen Bruchpunkte vermutlich deletiert, wurde ebenfalls auf die Veränderung des *Escaper*-Phänotyps untersucht. Der Effekt war nicht einheitlich. Während die meisten *Escaper* keine Veränderung des Phänotyps zeigten und eher eine mittlere Ausprägungsstärke aufwiesen, traten auch Fliegen auf, deren Ausprägung die stärksten *kette*^{J1-70}/*kette*^{A2-6}-Phänotypen kopiert oder sogar übertrifft (Abb.21). In der Thoraxmitte entlang der bilateralen Symmetrieachse fehlen

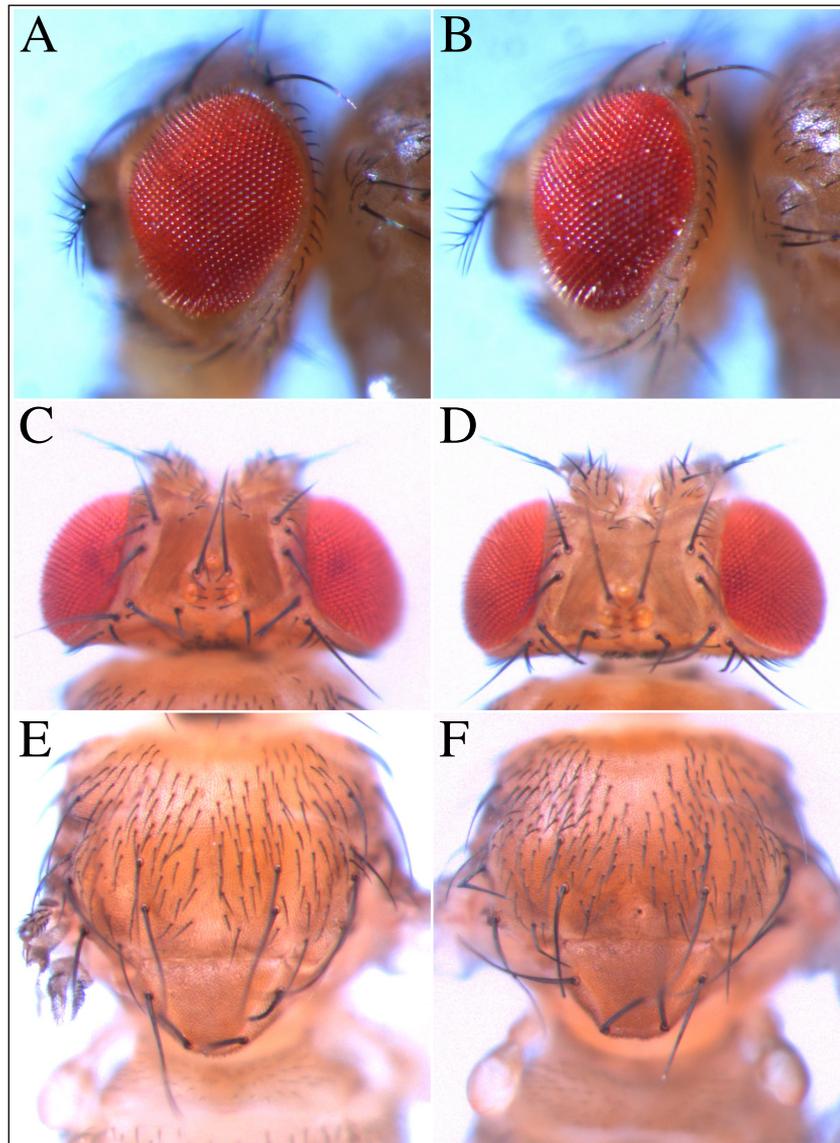


Abb. 20: Modifikationen des hypomorphen *kette*-Phänotyps.

(A-F) Präparationen adulter Fliegen. (A, C, E) Phänotypen des Genotyps *kette*^{J1-70}/*kette*^{Δ2-6}. (B, D, F) *kette*^{J1-70}/*kette*^{Δ2-6}, verändert durch eine Defizienz oder ein P-Element im Hintergrund. (B) Der *Escaper*-Phänotyp wird verstärkt durch das P-Element *Sc205634* im Hintergrund. (D, F) Verstärkung durch die Deletion *Df(3L)GN19* im Hintergrund. Alle Abbildungen sind Projektionen.

Mikrochaeten, was bei den Kontroll-*Escapern* nur selten und in geringerer Menge beobachtet werden kann (Abb. 21). Ein Großteil der Makrochaeten ist gebogen, gewellt oder geknickt. Die gebogenen Borsten, die im Bereich des Scutellums besonders auffallen, zeigen oft in falsche Richtungen und sind teilweise verkürzt. Diese morphologischen Veränderungen findet man auch bei Borsten der Kontroll-*Escaper*, jedoch treten sie bei manchen Fliegen, die die Deletion *Df(3L)GNI9* im Hintergrund tragen, gehäuft bei nahezu jeder Borste auf (Abb. 21). Da jedoch der Großteil der Fliegen keinen Unterschied zu den *kette*^{J1-70}/*kette*^{Δ2-6}-Fliegen erkennen ließ, konnte diese Defizienz nicht eindeutig als „verstärkend“ eingestuft werden. Eine genetische Interaktion wird für das Gen *Sc2* jedoch aufgrund dieser Ergebnisse angenommen und sollte anhand anderer Allele von *Sc2* überprüft werden.

3.2.2.2 Modifierscreen zur Identifizierung von KETTE-Interaktionspartnern

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung des KETTE-Proteins zeigt, dass der größte Teil des Proteins cytoplasmatisch vorliegt (Bogdan und Klämbt, 2003). An der Membran kann jedoch ebenfalls Protein nachgewiesen werden (Bogdan und Klämbt, 2003). Überexpression der wildtypischen Proteinform von KETTE mit Hilfe eines UAS*kette*-Konstruktes führt zu keinerlei Phänotyp, weder in der Fliege noch in Zellkultur mit *Drosophila Schneider2*-Zellen (*S2R*⁺-Zellen) (Bogdan und Klämbt, 2003). Die Überexpression einer membrangebundenen Form mit Hilfe eines UAS*kette*^{myr}-Konstruktes hat jedoch einen Phänotyp zur Folge. Neben Effekten auf die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten wird auch die Augenentwicklung von der Überexpression beeinflusst, was zu morphologischen Veränderungen führt (Bogdan und Klämbt, 2003). Die Augen sind rau und die kompakte Ommatidienstruktur geht verloren. Es ist eine Abhängigkeit der Stärke des Phänotyps von der Temperatur zu beobachten. Ein Temperaturshift von 25 °C auf 29 °C hat zur Folge, dass die Augen verkleinert erscheinen und nekrotisches Gewebe auftritt, das sich bei stärkster Ausprägung vom Rest des Auges abzulösen scheint (Abb. 23 C). Die Struktur des

Komplexauges ist dann nicht mehr zu erkennen. Bei beiden Temperaturen ist die Stärke der Ausprägung jedoch variabel (Abb. 22 A & B und 23 A & B).

Dieser Phänotyp wurde als Ausgangspunkt verwendet um weitere Interaktionspartner ausfindig zu machen. Ein Gen, das einen KETTE-Interaktionspartner kodiert, kann bei Ausfall der Genfunktion zur Veränderung des Phänotyps führen. Um weitere Interaktionspartner von KETTE aufzudecken, wurde ein Modifierscreen mit dem Ausgangsstamm *GMRGal4/GMRGal4; UASkette^{myr}/TM6* durchgeführt. Für die Mutagenese wurde aus praktischen Gründen der isogenisierte FRT80B-Stamm verwendet, der auch für die Gewinnung des *ketten*-FRT-Chromosoms eingesetzt wurde. Jeweils 50 drei Tage alte Männchen wurden 12-18 h lang gehungert und dann auf 25 mM EMS/Glukose-Lösung gesetzt. Nach 12-14 h wurden die Männchen auf frisches Futter überführt und nach 6-12 h mit *GMRGal4/GMRGal4; UASkette^{myr}/TM6*-Weibchen im Verhältnis 1:3 gekreuzt. Die Kreuzungen wurden jeden Tag auf frisches Futter umgesetzt und nach 4 Tagen wurde die Parentalgeneration verworfen. Die Nachkommen wurden auf Veränderung des Augenphänotyps untersucht, wobei nur die Tiere, die das TM6-Chromosom nicht trugen, beachtet wurden.

Von den insgesamt untersuchten etwa 15100 Fliegen zeigten 152 Fliegen eine Veränderung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps. Da auf diese Weise nur Einzelfliegen, die einen Effekt zeigten, isoliert werden konnten, war die Etablierung nicht immer erfolgreich. 120 Kandidaten standen für die weitere Untersuchung zur Verfügung, es zeigte sich jedoch bereits vor Abschluss der Analyse, dass die Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern nicht geeignet war. Der Phänotyp der *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Fliegen war in sich zu variabel und infolgedessen eine Fliege mit verändertem Phänotyp nicht aussagekräftig. Ein Defizienzenkitscreen wurde deshalb als die vielversprechendere Methode angesehen.

3.2.2.3 Auswirkungen von Deletionen auf den Phänotyp der *GMRGal4; UASkette^{myr}*- Fliegen

Um möglichst viele Gene auf eine solche Veränderung hin untersuchen zu können, ohne jeweils nur eine Vergleichsfliege zu haben, wurde das Defizienzenkit des Bloomington Stock Centers für einen *Screen* verwendet. Alle 212 Stämme des

Defizienzenkits wurden einzeln gegen *GMRGal4*; *UASkette^{myr}*-Fliegen verkreuzt und die Auswirkungen dann visuell beurteilt. Dabei wurde ein Großteil sowohl bei 25 °C als auch bei 29 °C begutachtet, um auch schwache oder temperatursensitive Effekte zu entdecken. Die genaue Liste des Defizienzenkits, wie es im Mai 2002 erhältlich war, ist unter Angabe der Stammmummern, der Defizienzenbruchpunkte und der phänotypischen Auswirkungen im Anhang IX dargestellt. Im Folgenden werden die Defizienzen vorgestellt, die eine Veränderung des Phänotyps zur Folge haben.

3.2.2.3.1 Defizienzen, die zu einer Abschwächung des *GMRGal4*; *UASkette^{myr}*-Phänotyps führen

Von den getesteten 43 X-chromosomalen Deletionen erzeugt nur die Deletion *Df(1)BK10* eine Abschwächung des Phänotyps (Abb. 22 C). Während man bei 25 °C unter den Tieren des Genotyps *GMRGal4*; *UASkette^{myr}* einige findet, deren Augen kaum noch eine Struktur von Einzelommatidien erkennen lassen, ähnelt der Phänotyp mit der eingekreuzten Defizienz sehr der schwächsten Ausprägung des *GMRGal4*; *UASkette^{myr}*-Phänotyps. Deutlich ist die Struktur des Auges zu erkennen und die Einzelommatidien lassen sich einzeln ansprechen. Dennoch sind die Augen eindeutig rau. Im Bereich der Defizienz liegt kein im *Hefe-2-Hybrid-Assay* gefundenes Gen, sie umschließt den Bereich 016A02-016C07-10.

Einen ähnlichen Effekt erzielt die Defizienz *Df(2L)C144*, die ebenfalls die Struktur im Auge wieder verdeutlicht (Abb. 22 D). Die Abschwächung des Phänotyps ist nicht ganz so deutlich wie bei der Defizienz *Df(1)BK10*, es treten jedoch keine Tiere mit stärkerem Phänotyp auf. Auch in dem von dieser Defizienz deletierten Bereich von 023A02-03 bis 023C03-05 befindet sich kein Kandidat aus dem *Hefe-2-Hybrid-Assay*. Eine Reduktion in der Ausprägungsstärke des Phänotyps zeigt auch die Defizienz *Df(2L)sc19-8*, die zwar ebenfalls keinen wildtypischen Zustand des Auges wiederherstellt, aber im Aufbau des Auges mehr Struktur erkennen lässt (Abb. 22 E). Der Effekt konnte auf 29 °C nicht bestätigt werden, da die entsprechenden Fliegen bei dieser Temperatur nicht geschlüpft sind. Auch der Bereich dieser Deletion, 024C02-08; 025C08-09, enthält keine vom *Y2H* aufgedeckte Transkriptionseinheit, die ein potentiell mit KETTE interagierendes Protein codiert.

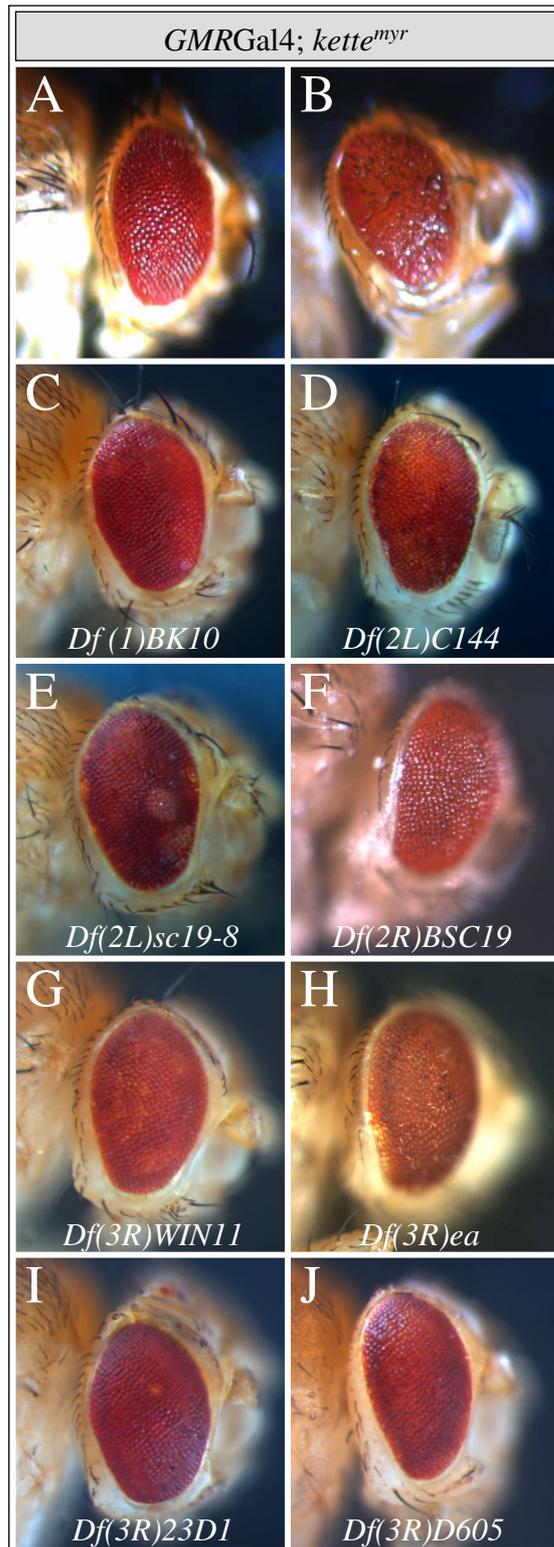


Abb. 21: Modifizierung des Augenphänotyps des *kette^{myr}*-Konstruktes, getrieben mit *GMRGal4*.

(A, B) Variabilität des *kette^{myr}*-Phänotyps bei 25 °C. (C-J) Abschwächung des Phänotyps durch Einkreuzen verschiedener Defizienzen in den Hintergrund. Bei allen Defizienzen ist mehr Struktur des Komplexauges zu erkennen. Der Phänotyp ähnelt der schwächsten Ausprägung der Kontrolltiere, Erläuterungen siehe Text. Die Abbildungen C-E und G, I, J sind Projektionen.

Die *Df(2R)BSC19* scheint ebenfalls eine abschwächende Wirkung auf den untersuchten Phänotyp zu haben (Abb. 22 F), wenn auch der Effekt nicht immer eindeutig erkannt werden konnte. Es treten keine Tiere mehr auf, deren Augen einen völligen Verlust der Ommatidienstruktur aufweisen. Der Phänotyp ähnelt sehr der schwächeren Ausprägung der Kontroll-Tiere. Auf 29 °C erkennt man eine Verkleinerung der nekrotischen Bereiche (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wirken die Augen etwas strukturierter. Die Bruchpunkte der Defizienz liegen bei 056F12-14-057A04 und die Deletion umfasst keines der Gene, die als potentielle Interaktionskandidaten im *Y2H*-Assay entdeckt wurden.

Abb. 22 G zeigt den Effekt der Defizienz *Df(3R)WIN11* auf den *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyp. Es kann eine deutlichere Struktur der Ommatidien beobachtet werden. Der Effekt zeigte sich nicht auf 29 °C, was möglicherweise auf eine Temperatursensitivität zurückzuführen sein könnte. Es ist aber auch denkbar, dass der Effekt so schwach ist, dass er bei der sehr stark gestörten Entwicklung auf 29 °C nicht ins Gewicht fällt. Ob die Defizienz, die bei 083E01-02; 084A04-05 liegt, das im *Y2H*-Assay gefundene *amalgam (CG2198)* bei 084A05 betrifft, ist nicht eindeutig zu klären, da die Bruchpunkte der Deletion nicht molekular untersucht sind.

Der Effekt der Defizienz *Df(3R)ea* ist besonders interessant, da diese Defizienz, deren Bruchpunkte 088E07-13-089A01 sind, das Gen *Sra-1* deletieren sollte, das bei 88F1 liegt. Unabhängig von den im *Y2H* gefundenen potentiellen Kandidaten, ist SRA-1 bereits ein bekannter Interaktionspartner von KETTE (Eden *et al.*, 2002, Bogdan *et al.*, 2004). Der Phänotyp ist abgeschwächt und mehr Struktur ist erkennbar (Abb. 22 H). Auf 29 °C sind kaum nekrotische Bereiche zu erkennen und ein Teil der Struktur ist weiterhin sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Die Deletion *Df(3R)23D1* bewirkt ebenfalls eine Abschwächung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps (Abb. 22 I). Die Augen wirken strukturierter und geordneter. Die Einzelommatidien sind einzeln ansprechbar und es treten keine Tiere auf, die dem bei den Kontroll-Tieren vorkommenden stärkeren Phänotyp ähneln. Der Effekt ist auf 29 °C nicht zu erkennen. Die Defizienz reicht von 094A03-04 bis 094D01-04 und beinhaltet keine Transkriptionseinheit, die aufgrund des *Y2H*-Experimentes als potentieller Kandidat hervortritt.

Der Effekt der Defizienz *Df(3R)D605* konnte nur bei 25 °C beurteilt werden, da eine Kreuzung bei 29 °C nicht erfolgreich war. Die Augen zeigen eine deutliche Abschwächung gegenüber den Kontroll-Tieren und die Ommatidienstruktur ist deutlich erkennbar (Abb. 22 J). Ein Blick über die Oberfläche zeigt in einigen Bereichen die Ordnung der Ommatidien in Reihen. Auffällig ist aber die leicht andere Form des Auges. Es ist etwas schmaler und länglicher als das *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Auge. Im Bereich dieser Defizienz, deren Bruchpunkte bei 097E03 und 098A05 liegen, befindet sich unter anderem die Transkriptionseinheit *CG6478*, von der sich ein im *Y2H-Assay* als potentieller Kandidat ermitteltes Protein ableitet.

Insgesamt ähnelten die Abschwächungsphänotypen immer der schwachen Ausprägung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps. Eine Abschwächung bis zur wildtypischen Entwicklung des Auges konnte nicht beobachtet werden. Da die Effekte zwischen den einzelnen Tieren variierten und bereits der Ausgangsphänotyp recht variabel war, wurden viele Kreuzungen zur Absicherung des Ergebnisses wiederholt.

3.2.2.3.2 Defizienzen, die zu einer Verstärkung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps führen

Vier Defizienzen des X-chromosomalen Defizienzenkits zeigten einen verstärkenden Effekt auf den *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyp.

Bei der Defizienz *Df(1)ct-J4* konnte auf 25 °C eine Verstärkung des Phänotyps beobachtet werden, die sich auf 29 °C nicht nachweisen ließ. Die Augen waren etwas kleiner und zeigten deutlich nekrotisches Gewebe. Teilweise konnten keine Einzelommatidien mehr unterschieden werden (Abb. 23 D). Die Defizienz erstreckt sich von 007A02-03 bis 007C01 und in diesem Bereich liegt keine im *Hefe-2-Hybrid-Assay* aufgefallene Transkriptionseinheit.

Die Defizienz *Df(1)lz-90b24* konnte nur auf 25 °C beurteilt werden. Die Auswirkungen dieser Deletion auf den beschriebenen Phänotyp sind aber schon bei dieser Temperatur drastisch (Abb. 23 E). Die Augen sind sehr stark verkleinert und zeigen keinerlei Einzelommatidienstruktur mehr. Es gibt große Bereiche nekrotischen Gewebes, die teilweise so umfangreich sind, dass es den Anschein hat, es würde sich beinahe das gesamte restliche Auge vom Kopf ablösen. Die Bruchpunkte dieser Defizienz sind

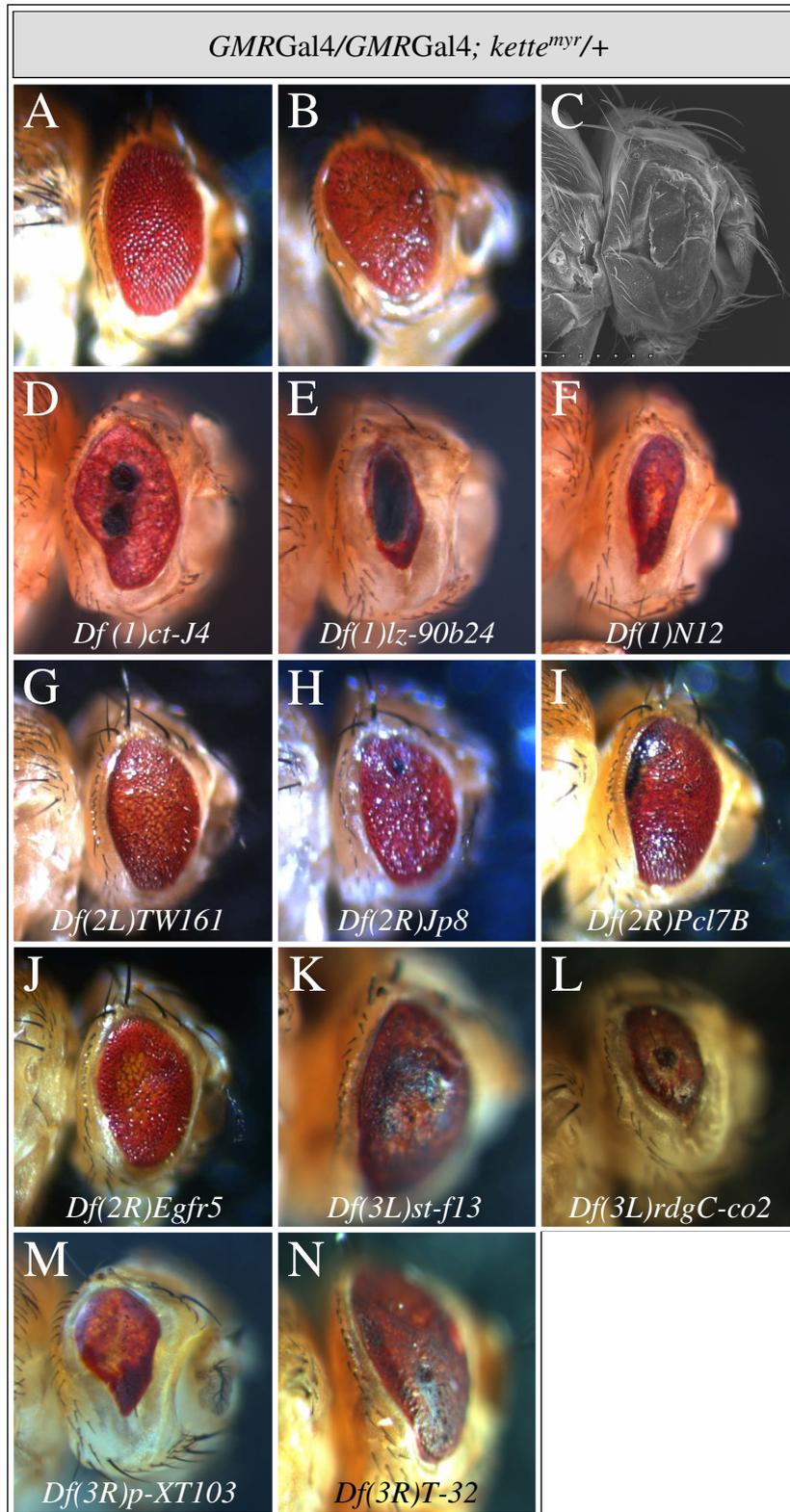


Abb. 22: Modifizierung des Augenphänotyps des *kette^{myr}*-Konstruktes, getrieben mit *GMRGal4*.

(A; B) Variabilität des *kette^{myr}*-Phänotyps bei 25 °C und (C) bei 29 °C. (D-O) Verstärkung des Phänotyps durch Einkreuzen verschiedener Defizienzen in den Hintergrund. (D, E, H-L, N, O) Phänotypen bei 25 °C. (F, G, M) Phänotypen bei 29 °C. Die Defizienzen sind in der Reihenfolge ihrer Lokalisation angegeben. Bei allen Defizienzen ist die Struktur des Komplexauges stark verändert, die Augen sind häufig kleiner und nekrotische Flecken sind zu erkennen. Erläuterungen siehe Text.

Die Abbildungen D-G und N sind Projektionen und F wurde hydriert.

nicht genau ermittelt. Es gibt zwei mögliche Positionen, eine zwischen 008B05-06 und 008D08-09 und eine zwischen 008D01-02 und 008E01-02. Keiner der beiden Bereiche korreliert mit einer im *Hefe-2-Hybrid-Assay* ermittelten Transkriptionseinheit.

Ein sehr starker Effekt auf die Ausprägung des Phänotyps konnte für die Defizienz *Df(1)N12* auf 29 °C beobachtet werden (Abb. 23 F). Die Augen waren deutlich kleiner, schmaler und glänzend. Eine Struktur schien nicht mehr vorhanden zu sein und das Auge bildete eine gleichmäßige Fläche. In Bereichen des Auges schien jedoch die Pigmentbildung im Auge gestört zu sein, da sie deutlich heller waren. Größere nekrotische Bereiche konnten in diesen Augen nicht mehr beobachtet werden. Auf 25 °C ähnelten nahezu alle Tiere den *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Fliegen (Daten nicht gezeigt). Die Bruchpunkte dieser Deletion sind bei *Bloomington* mit 011D01-02; 011F01-02 angegeben. Von den im *Hefe-2-Hybrid-Experiment* ermittelten potentiellen Kandidaten korrespondiert keiner mit diesem Bereich.

Im Vergleich mit den zuvor beschriebenen Deletionen zeigt die Defizienz *Df(2L)TW161* nur eine moderate Verstärkung, die eine Phänokopie der stärkeren Ausprägung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps ist (Abb. 23 H). Es treten jedoch keine Tiere auf, die eine schwächere Ausprägung zeigen. Daher wird auch dieser Effekt als eine Verstärkung angesehen. Der deletierte Bereich erstreckt sich zwischen 038A06-B01 und 040A04-B01, was keinem ermittelten Gen des *Hefe-2-Hybrid-Experimentes* entspricht.

Der Effekt der Deletion *Df(2R)Jp8* ist ebenfalls nicht sehr stark (Abb. 23 I). Die Augen machen einen flächigen Eindruck und alle Tiere entsprachen der stärkeren Ausprägung des Phänotyps bei 25 °C. Nach dem Temperaturshift auf 29 °C war kein Effekt nachzuweisen. Die Bruchpunkte der Defizienz liegen bei 052F05-09; 052F10-053A01, einem Bereich, der mit keiner im *Y2H* gefundenen Transkriptionseinheit korrespondiert.

Eine interessante Veränderung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps ergab sich für die Deletion *Df(2R)Pcl7B*, die sowohl auf 25 °C als auch auf 29 °C einen „Lidschatten“-Effekt erzeugte (Abb. 23 J). Die Augen, deren Struktur sich nicht sehr von der der Kontroll-Tiere unterschied, zeigten am posterioren Rand einen Streifen nekrotischen und damit schwarzen Gewebes. Der Temperaturshift auf 29 °C veränderte

den Effekt nicht. Der Bereich der Defizienz zwischen den Bruchpunkten 054E08-F01 und 055B09-C01 war im *Y2H-Assay* nicht von Bedeutung.

Unter Einfluss der Deletion *Df(2R)Egfr5* erscheinen die Augen der *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Fliegen verkleinert und flächig (Abb. 23 K). Die Struktur der Einzelommatidien ist kaum noch zu erkennen und zum Teil können Pigmentierungsdefekte beobachtet werden. Der Effekt ist bei 25 °C deutlicher zu erkennen als bei 29 °C. Die Deletion liegt bei 057D02-08; 058D01 und umfasst keines der Gene, die im *Hefe-2-Hybrid-Experiment* aufgedeckt wurden.

Von den 84 getesteten Defizienzen des dritten Chromosoms zeigten vier eine Verstärkung des untersuchten Phänotyps. Die Deletion *Df(3L)st-f13* verursacht den Verlust der Einzelommatidienstruktur und die Augen wirken flächig (Abb. 23 L). Nekrotische Bereiche sind an der schwarzen Färbung zu erkennen, sie erscheinen jedoch nicht so abgegrenzt wie bei anderen Defizienzen, und eine Ablösung ist nicht zu erkennen. Die Augen scheinen auch nicht verkleinert zu sein. Die Bruchpunkte der Defizienz umfassen einen Bereich zwischen 072C01-D01 und 073A03-04. In diesem Bereich befinden sich zwei im *Hefe-2-Hybrid-Experiment* gefundene Gene, *CG16838* und *CG13047*.

Die Veränderung des *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Phänotyps, die die Defizienz *Df(3L)rdgC-co2* hervorruft, kann sowohl bei 25 °C als auch bei 29 °C beobachtet werden. Die Auswirkungen sind jedoch bei 29 °C noch stärker und resultieren in verkleinerten Augen, die zusätzlich nekrotische Bereiche zeigen (Abb. 23 M). Die Struktur des Auges ist stark gestört und die Ommatidien sind nicht mehr einzeln ansprechbar. Die Augen reflektieren auch das Licht verschieden und glänzen. Die Bruchpunkte der Defizienz liegen bei 077A01 und 077D01. In dieser Gegend liegt kein potentieller Interaktionspartner des *Y2H-Experimentes*.

Bei 25 °C ist der Effekt der Deletion *Df(3R)p-XT103* sehr stark (Abb. 23 N). Die Augen sind verkleinert und unregelmäßig. Es gibt keine Struktur der Ommatidien mehr, die Augen glänzen und die Pigmentierung ist nicht gleichmäßig. Der Effekt ist auf 29 °C nicht nachzuweisen. Im Bereich der Defizienz, 085A02 bis 085C01-02, liegt keine im *Hefe-2-Hybrid-Experiment* ermittelte Transkriptionseinheit.

Die Deletion *Df(3R)T-32* im Hintergrund der *GMRGal4; UASkette^{myr}*-Fliegen führte bei 25 °C zu nekrotischen Bereichen, die über das ganze Auge verteilt vorlagen und teilweise als Unebenheiten sichtbar waren (Abb. 23 O). Die Augen wirkten flächiger und wiesen nur noch wenig Struktur auf. Auch eine schwache Verkleinerung des Auges war zu erkennen. Eine Überprüfung auf 29 °C war nicht möglich, da der Defizienzenstamm sehr schwach war. Die Bruchpunkte der Defizienz sind mit 086E02-04 und 087C06-07 angegeben und in diesem Bereich befindet sich kein Kandidat des *Hefe-2-Hybrid-Experimentes*.

Insgesamt waren die verstärkenden Effekte meist deutlicher zu sehen als die abschwächenden, da in den meisten Fällen Augengewebe verloren ging. Eine genauere Eingrenzung auf die Gene, die innerhalb der Defizienzen für die beobachteten Effekte verantwortlich waren, wurde nicht durchgeführt. Die Anzahl der gefundenen Defizienzen, die einen Effekt ausmachen, legt jedoch nahe, dass noch unidentifizierte Interaktionspartner von KETTE existieren. Von den bereits beschriebenen Interaktionspartnern wurde nur die *Sra-1*-Defizienz in diesem Versuch mit einem Effekt auf den Phänotyp beschrieben.

3.2.3 Untersuchungen AKTIN-abhängiger Prozesse

Der Einfluss von KETTE auf das AKTIN-Zytoskelett wurde bereits erwähnt. Auch die bereits bekannten Interaktionspartner von KETTE, SRA-1, ABI und DOCK zeigen Effekte auf AKTIN-abhängige Prozesse, die zum Teil bereits gut erforscht sind. Die genaue Wirkungsweise bedarf jedoch weiterer Klärung. Anhand zweier verschiedener Modelle wurden im Folgenden Effekte untersucht.

3.2.3.1 Der Einfluss von *kette* und *Sra-1* auf die Ausbildung der neuromuskulären „Junction“ (NMJ)

Die neuromuskuläre „Junction“ (NMJ) ist der Verbindungspunkt zwischen Muskel und Motoneuron. Die Bildung neuer Synapsen an einer Nervenendigung kann auf zwei Arten erfolgen. Zum einen durch asymmetrisches „sprouting“, zum anderen durch symmetrische Teilung bereits vorhandener Boutons (Zito, 1999; Mathew *et al.*, 2002).

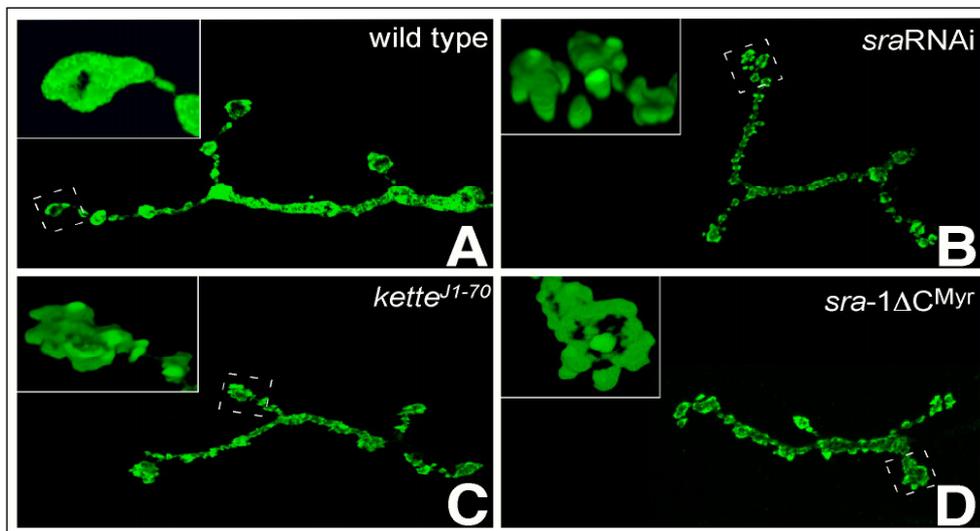


Abb. 23: Phänotypen der neuromuskulären *Junction* (NMJ). (A-D) Präparationen an Muskel vier des Larvenstadiums 3 und Färbung mit dem präsynaptischen Marker mAB nc46. (A) Im Wildtyp erkennt man die rundliche, wenig dreidimensionale Form der Endboutons mit einer begrenzten Anzahl von Knospen. (B) Die Expression von *Sra-1*-RNAi durch *elavGal4* führt zu überzähligen Knospen und einer prominenten 3D-Struktur. (C) Eine ähnliche Struktur kann in *Escaper*-Larven von *kette^{Δ2-6}/kette^{J1-70}* beobachtet werden. (D) Das SRA-1 Δ C^{Myr}-Protein ist nicht in der Lage KETTE zu binden. Eine Expression des Konstruktes durch *elavGal4* erwirkt einen ähnlichen Phänotyp wie die Reduktion von SRA-1 und KETTE.

Beide Prozesse erfordern ein präzise kontrolliertes und reguliertes Zytoskelett (Luo, 2002; Notarangelo und Ochs, 2003). Um Effekte auf das Zytoskelett anhand dieses Modells zu untersuchen, wurden verschiedene Konstrukte mit *elavGal4* getrieben, sowie die *kette*-Escaper auf ihren NMJ-Phänotyp untersucht. Zur Auswertung wurden jeweils 60 endständige Boutons des Muskels 4 untersucht (Abb. 24). Die genauen Zahlen sind im Anhang XI einzusehen. Das bereits als KETTE-Interaktionspartner beschriebene Protein SRA-1 führt bei Verlust zu Defekten in der synaptischen Architektur (Schenck *et al.*, 2003). Die Expression eines *Sra-1*-RNAi-Konstruktes durch *elavGal4* hat eine vermehrte Knospenbildung zur Folge. Es sind zweimal so viele Knospungen zu beobachten wie in der wildtypischen Situation (Abb. 24 A & B). Zudem ergibt sich daraus eine ausgebuchtete 3D-Struktur der normalerweise flach anliegenden Boutons (Abb. 24 B). Ein entsprechender Phänotyp ergibt sich auch für die hypomorphen *kette*-Fliegen, die anhand des *Tubby*-Markers der TM6-Tiere selektioniert wurden. Es wurde die 2,1-fache Menge an Knospen an den Boutons der *Escaper*-Larven festgestellt und ebenfalls eine irreguläre 3D-Struktur (Abb. 24 C). Wie gezeigt werden konnte, bindet SRA-1 KETTE mit dem C-Terminus des Proteins (Bogdan *et al.*, 2004) und die Membranrekrutierung von KETTE konnte als funktionell essentieller Schritt angesehen werden (Bogdan und Klämbt, 2003). Es wurde daher auch der Einfluss eines membranverankerten C-terminalen Verkürzungskonstruktes auf die synaptische Architektur getestet, *Sra-1ΔC^{myr}*, dem eine dominant negative Wirkung nachgewiesen wurde (Bogdan *et al.*, 2004). Das Ergebnis entspricht den zuvor beschriebenen Effekten. Das durch *elavGal4* in allen Neuronen exprimierte Konstrukt bewirkte einen Anstieg der Anzahl der Bouton-Knospen um das 2,3-fache (Abb. 24 D). Die Struktur der Endboutons ist ebenfalls gestört und zeigt Ausbuchtungen und Wölbungen, wie sie zuvor für die *kette*-Escaper und die Expression des *Sra-1*-RNAi-Konstruktes beschrieben wurden (Abb. 24 D). Die Beteiligung von *kette* und *Sra-1* im gleichen Prozess konnte demnach für den Aufbau der NMJ genetisch bestätigt werden, wobei die Bindung zwischen beiden von essentieller Bedeutung zu sein scheint.

3.2.3.2 Der Interaktionspartner *dreadlocks* (*dock*)

Ein Komplex beinhaltend NAP-1, SRA-1 und ABI ist von essentieller Bedeutung für die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts (Eden *et al.*, 2002). Überexpressionsstudien an den genannten Mitgliedern dieses Komplexes zeigen, dass alle drei Proteine ihre Funktion an der Membran ausüben und die Membranlokalisation daher als essentieller Schritt für die Aktivität angesehen werden kann (Bogdan und Klämbt, 2003, Bogdan *et al.*, 2004). Offen blieb allerdings bisher die Frage, wie die Membranrekrutierung der Komplexkomponenten erreicht wird und welche Proteine dafür als signifikant angesehen werden können.

Für das Protein DOCK ist bereits eine genetische Interaktion mit KETTE im Hinblick auf axonale Wegfindungsprozesse von Photorezeptoren beschrieben worden (Hummel, 2000). Zwar ist noch unklar, ob DOCK und KETTE in diesem Zusammenhang physisch interagieren, für ihre Säugerhomologe NCK und NAP-1 wurde jedoch die Bildung eines Komplexes *in vivo* nachgewiesen (Kitamura *et al.*, 1996). Weitere Daten sprechen für eine Rolle von NCK bei der Regulation von WAVE (Eden *et al.*, 2002) und biochemische Untersuchungen zeigen die Bindung von SRA-1 an NCK (Kitamura *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1998) und von ABI und WASP an DOCK (persönliche Kommunikation mit Dr. Sven Bogdan). Zudem konnte belegt werden, dass NCK/DOCK andere Proteine an die Membran rekrutieren kann (Galisteo *et al.*, 1996; Hing, *et al.*, 1999). Das SH2-SH3-adapter-Protein DOCK ist damit der vielversprechendste Kandidat, die Membranrekrutierung zu gewährleisten. Der größte Teil der Untersuchungen AKTIN-abhängiger Prozesse in dieser Arbeit konzentriert sich daher auf Analysen der DOCK-Funktion.

3.2.3.2.1 Verwendete UAS-*dreadlocks* (*dock*)-Konstrukte

Die Expression membranverankerter Formen von KETTE, SRA-1 und ABI haben gezeigt, dass es sich um aktivierte Zustände der entsprechenden Proteine handelt. Um eine *gain-of-function*-Analyse auch für das Protein DOCK durchführen zu können, wurden ebenfalls membranverankerte Formen exprimiert. Die analogen Konstrukte wurden in der Diplomarbeit von Dipl.-Biologe Raiko Stephan erstellt und im Rahmen

meiner Arbeit injiziert und untersucht. Die Proteinstruktur von DOCK zeigt drei SH3-Domänen und eine C-terminale SH2-Domäne, die für die Membranrekrutierung von DOCK an aktivierte Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) relevant ist (Li *et al.*, 2001, Buday *et al.*, 2002). Um eine möglichst vollständige Analyse der DOCK-Funktion zu erhalten, wurden neben der wildtypischen Proteinform auch mutante Proteinformen untersucht, die Punktmutationen in den SH3-Domänen aufweisen. Es ist jeweils ein konserviertes Tryptophan gegen ein Lysin ausgetauscht, was eine Bindung an prolinreiche Sequenzen verhindert und damit die Funktionalität der Domäne unterbindet (Rao und Zipursky, 1998). Auch die einzelnen SH3-Domänen wurden untersucht. Die Struktur der verwendeten Konstrukte ist in Abb. 25 dargestellt.

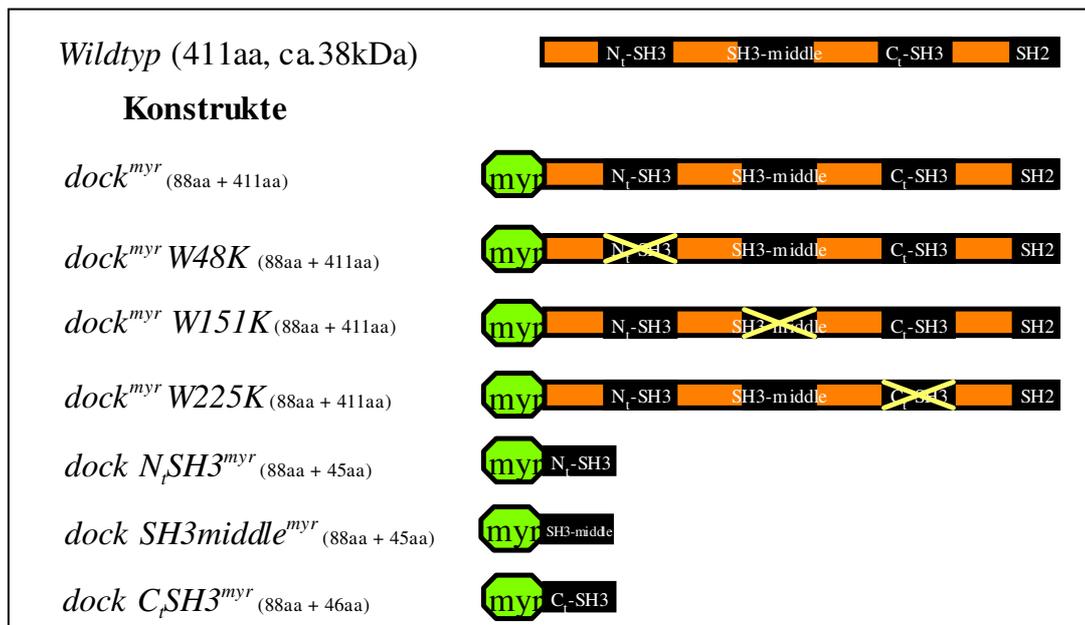


Abb. 25: Übersicht der membranverankerten *dock*-Konstrukte. Die Größe der erhaltenen Proteine ist angegeben. myr: N-terminales Myristilierungssignal; die Querstriche stehen für eine Punktmutation, die den Verlust der Bindungsfähigkeit bedeutet. (Abb. modifiziert nach Stephan, 2004)

3.2.3.2.2 Analyse des Effektes auf *S2R*⁺-Zellen

Im Rahmen der Untersuchungen auf die Funktionalität und zelluläre Verteilung der Konstrukte wurden Transfektionen von *Drosophila Schneider2R*⁺-Zellen (*S2R*⁺-Zellen) durchgeführt. Der Nachweis des DOCK-Proteins wurde mit Hilfe des α -DOCK-Antikörpers vorgenommen (Abb. 26). Für die einzelnen SH3-Domänen war keine Färbung nachweisbar, wofür zwei Erklärungen denkbar sind. Zum einen könnten die

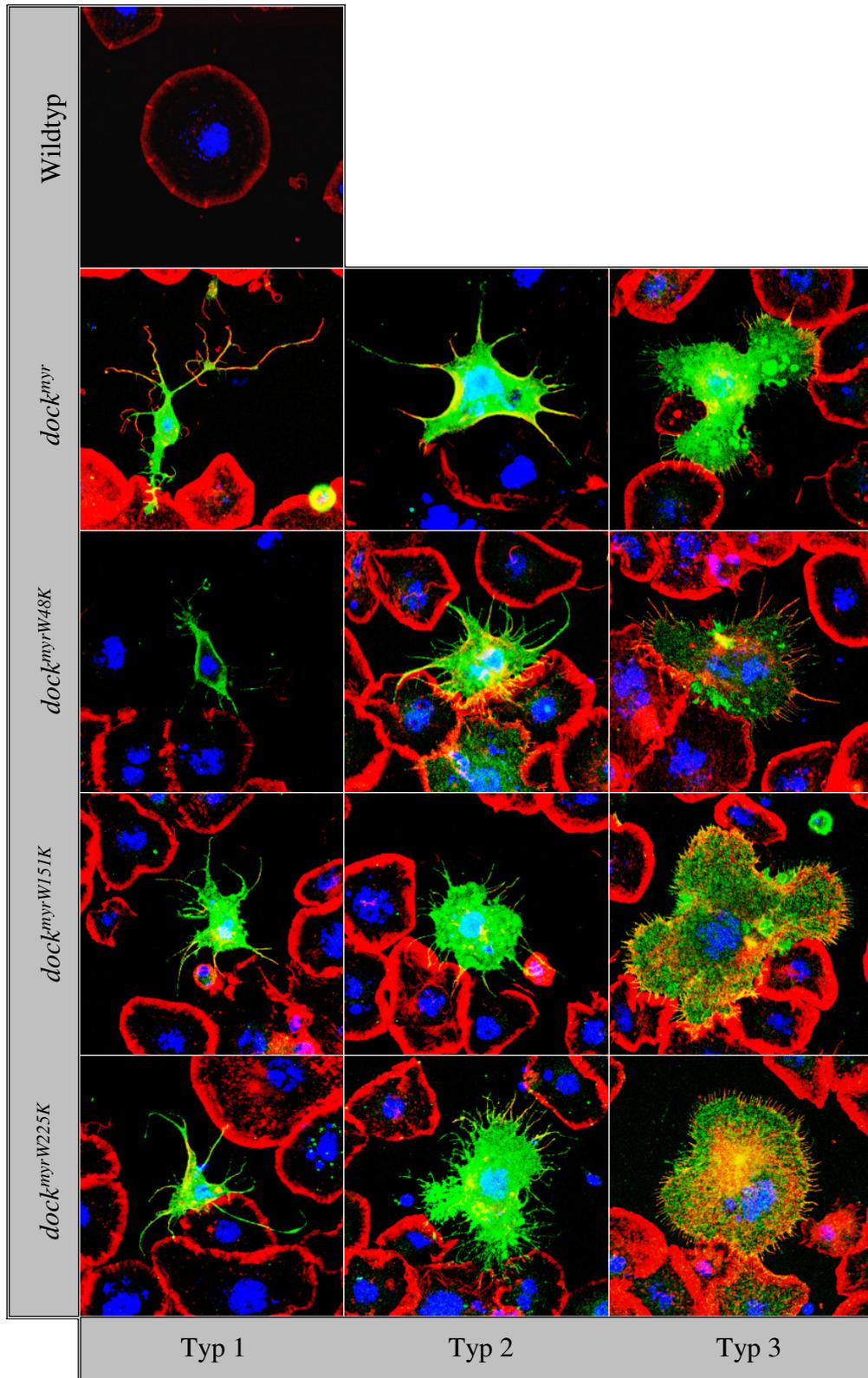


Abb. 25: S2R+-Zellen, transfiziert mit den myristylierten *dock*-Konstrukten. Immun-Fluoreszenzfärbungen mit α -DOCK-Antikörper (grün), Phalloidin (rot) und DAPI (blau). Die Transfektionen führen zu ähnlichen Phänotypen, die sich in drei Kategorien klassifizieren lassen, Typ 1-, Typ 2- und Typ 3-Zellen. Erläuterungen siehe Text.

Konstrukte nicht funktional sein, zum anderen wäre möglich, dass eine einzelne SH3-Domäne kein Epitop für den Antikörper stellt. Die mit den übrigen Konstrukten transfizierten Zellen zeigten starke morphologische Veränderungen. Die erhaltenen Phänotypen ähnelten sich sehr stark und konnten in drei Gruppen eingeteilt werden. Typ-1-Zellen waren sehr klein, leuchteten intensiv und hatten zum Teil im Vergleich zu ihrer Zellgröße enorme Zellfortsätze, in denen ebenfalls das membranverankerte DOCK-Protein lokalisiert war (Abb. 26). Dieser Phänotyp erinnert an die Phänotypen, die durch RNAi von KETTE, ABI oder WASP an *S2R*⁺ Zellen erhalten werden. Die Typ-2-Zellen waren von mittlerer Größe und auch die Zellfortsätze erschienen im Vergleich zur Zellgröße etwa mittellang (Abb. 26). Die Typ-3-Zellen waren große, flächige Zellen mit im Vergleich zur Zellgröße kleinen Fortsätzen, so genannten „spikes“ (Abb. 26). Dieser Phänotyp spiegelt den Überexpressionsphänotyp von membranassoziertem WASP wieder. In allen Transfektionen und für alle gefundenen Zelltypen galt eine Kollokalisierung von membranverankertem DOCK mit F-AKTIN, das mit Phalloidin gefärbt worden war. Insgesamt war kein Anstieg des AKTIN-Levels in den transfizierten Zellen sichtbar, ein genauer Vergleich war jedoch aufgrund der strukturellen Unterschiede schwierig. Tabelle 2 gibt die prozentualen Anteile der gefundenen Zelltypen innerhalb der transfizierten Zellen an. Gezählt wurden jeweils mindestens 100 transfizierte Zellen.

Tabelle 2: Übersicht über die beobachteten Zelltypen nach Transfektion mit verschiedenen DOCK-Konstrukten.

Konstrukt	Typ-1-Zellen	Typ-2-Zellen	Typ-3-Zellen	Zellen mit <i>Wt</i> -Phänotyp
<i>dock^{myr}</i>	19%	54%	27%	0%
<i>dock^{myr}W48K</i>	30%	58%	11%	1%
<i>dock^{myr}W151K*</i>	25%	49%	13%	12%
<i>dock^{myr}W225K*</i>	34%	57%	4%	3%

*aufgrund von Rundungsdifferenzen ergibt die Gesamtsumme nicht 100%. n \geq 100

In den mit den Konstrukten *dock^{myr}W48K*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* transfizierten Ansätzen fanden sich in unterschiedlicher Anzahl Zellen, die zwar

transfiziert waren und daher eine Färbung mit dem pAB α -DOCK zeigten, aber phänotypisch dem Wildtyp glichen.

Eine weitere Besonderheit der transfizierten Zellen war auffällig. Die Zellen zeigten mitunter „Aggregate“, Strukturen auf der Zelloberfläche, die eine verstärkte Expression von DOCK aufwiesen. In diesen Strukturen konnte besonders viel AKTIN beobachtet werden (Abb. 27). Somit konnte eine Korrelation zwischen erhöhter Aktinpolymerisation und einem erhöhten DOCK-Proteinlevel hergestellt werden.

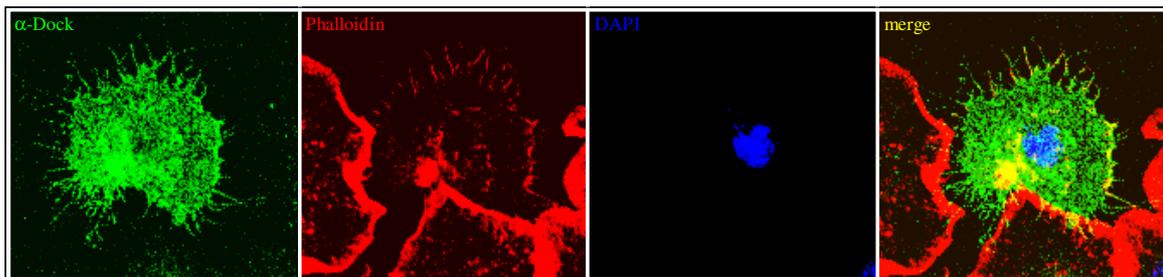


Abb. 27: „Aggregat“-Phänotyp der *S2R+*-Zellen, dargestellt am Beispiel einer mit *dock^{myr}W225K* transfizierten *S2*-Zelle. Deutlich erkennbar sind die an der Zelloberfläche befindlichen Strukturen, die mit Aktin kolokalisieren.

3.2.3.2.3 Phänotypische Analyse der mit *scaGal4* getriebenen Insertionen

Zur Generierung transgener Fliegenstämme mit den in Abb. 25 aufgeführten Konstrukten wurde eine Keimbahntransformation durchgeführt (*M & M* 2.2.1.11). Tabelle 3 gibt Auskunft über die Menge der injizierten Embryonen, die erhaltenen transgenen Fliegen und die analysierten Linien. Die entsprechenden Zahlen sind in der Tabelle einzeln aufgeführt. Als „positiv“ wurden Kreuzungen angesehen, in denen aufgrund der w^+ -Markierung transgene Fliegen aufgefunden wurden. Bereits in diesen Kreuzungen wurde deutlich, dass es bei den injizierten Fliegen zum Teil zu multiplen Insertionen gekommen war, wie unterschiedliche Augenfarben belegten. In der Tabelle stimmen daher die Anzahlen der „positiven“ Kreuzungen und der analysierten Linien nicht überein. Je nach Reproduzierbarkeit und Menge der Linien, die einen Phänotyp zeigten, wurden nicht alle erhaltenen Insertionen in die Analyse mit einbezogen. Eine Tabelle der untersuchten Linien und ihrer Wertung befindet sich im Anhang XII. Im Folgenden wird nur zwischen den Konstrukten unterschieden.

Tabelle 3: Übersicht der generierten transgenen Linien mit Hilfe der Keimbahntransformation.

Konstrukt	Anzahl der injizierten Embryonen	Anzahl der „positiven“ Kreuzungen	Anzahl der analysierten Linien
<i>dock^{myr}</i>	700	1	1
	600	38	5
<i>dock^{myr}W48K</i>	280	2	2
	360	13	25
<i>dock^{myr}W151K</i>	400	9	4
<i>dock^{myr}W225K</i>	400	18	6
<i>dockN_r-SH3^{myr}</i>	680	3	3
<i>dockSH3-middle^{myr}</i>	620	2	3
<i>dockC_r-SH3^{myr}</i>	880	13	3

Der Aktivatorstamm *scabrous*-Gal4 (*scaGal4*) ermöglicht eine Expression des Konstruktes in allen Vorläuferzellen mechanosensorischer Organe (*SOPs*), so dass er zur Untersuchung der entsprechenden Entwicklungsprozesse herangezogen werden kann. Die Analyse der erhaltenen Insertionen unter Verwendung dieses Treibers bezog sich daher vor allem auf die Borstenentwicklung als Modell für die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts.

Während die Expression der Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* schon bei oberflächlicher Betrachtung einen eindeutigen Phänotyp auswiesen, erbrachte die Überexpression der einzelnen SH3-Domänen keinen Phänotyp. Um Sicherheit darüber zu erlangen, ob alle Konstrukte in vergleichbarer Menge exprimiert wurden, wurde eine Antikörperfärbung mit dem pAB α -DOCK-Kaninchen an Flügelimaginalscheiben durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass die Expressionsstärke der für weitere Analysen genutzten Konstrukte *dock^{myr}* und *dock^{myr}W225K* vergleichbar erschien, während das Konstrukt *dock^{myr}W151K* etwas verstärkt exprimiert wurde. Diese Beobachtung konnte die phänotypische Analyse bestätigen.

Die einzelnen SH3-Domänen erbrachten wie schon bei der Untersuchung der *S2R⁺*-Zellen keine Färbung. Eine Aussage über die Expressionsstärke der einzelnen SH3-Domänen konnte daher nicht getroffen werden.

Eine der 27 isolierten Insertionen des *dock^{myr}W48K*-Konstruktes ergab einen ähnlichen Borsten-Phänotyp wie *dock^{myr}*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* und wurde für die weitere Analyse eingesetzt. Eine Färbung mit dem pAB α -DOCK-Kaninchen, um die Expressionsstärke der Insertion zu bestimmen wurde nicht durchgeführt.

Von den Einzel-SH3-Domänen abgesehen, zeigten die exprimierten Konstrukte insgesamt gesehen ähnliche Phänotypen betreffend die mechanosensorischen Borsten, die Augen- und die Flügelentwicklung (Abb. 28). Eine Ausnahme bildete die Insertion *dock^{myr}W48K*, für die kein Effekt auf die Flügelentwicklung und die Entwicklung der Ocellarborsten nachgewiesen werden konnte (Abb. 28 C). Die Expression von *dock^{myr}* hat einen starken Verlust der Ocellarborsten zur Folge. Auch die Konstrukte *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* zeigen weniger Ocellarborsten, jedoch nicht in vergleichbarer Stärke zu *dock^{myr}*. Die Konstrukte *dock^{myr}* und *dock^{myr}W151K* wirken sich zudem auf die motorischen Fähigkeiten der Fliegen aus, da diese häufig nicht richtig laufen konnten und deutlich öfter als die Kontrolltiere in den Puppen stecken blieben oder in das Futter stürzten und starben. Die Flügel dieser Tiere, sowie der *scaGal4/W225K*-Fliegen, sind nach unten gebogen und verkürzt. Der beobachtete Flügelphänotyp könnte in Zusammenhang mit der gestörten Motorik von Bedeutung sein, da die nach unten gebogenen Flügel die Tiere behindern. Es wurden jedoch häufig zwei Beine derselben Körperhälfte gleichzeitig bewegt und die Fliegen „traten auf der Stelle“. Mit zunehmendem Alter der Fliegen ließ der Effekt nach und die Bewegungsabläufe schienen sich zu normalisieren. Eine genauere Untersuchung dieses Teils des Phänotyps zum Beispiel im Hinblick auf die Innervierung der Muskeln wurde nicht durchgeführt.

Abb. 28 gibt einen Überblick der observierten Phänotypen bei 25 °C und heterozygot sowohl für das Konstrukt als auch für den Treiber *scaGal4*. Entwicklungsdefekte der mechanosensorischen Organe auf Kopf und Thorax betrafen nicht nur die Morphologie sondern auch die Anzahl der Borsten. Eine genaue Aufschlüsselung dieser Effekte ist in Abb. 31 dargestellt und wird im nächsten Abschnitt erläutert. In den Abschnitten

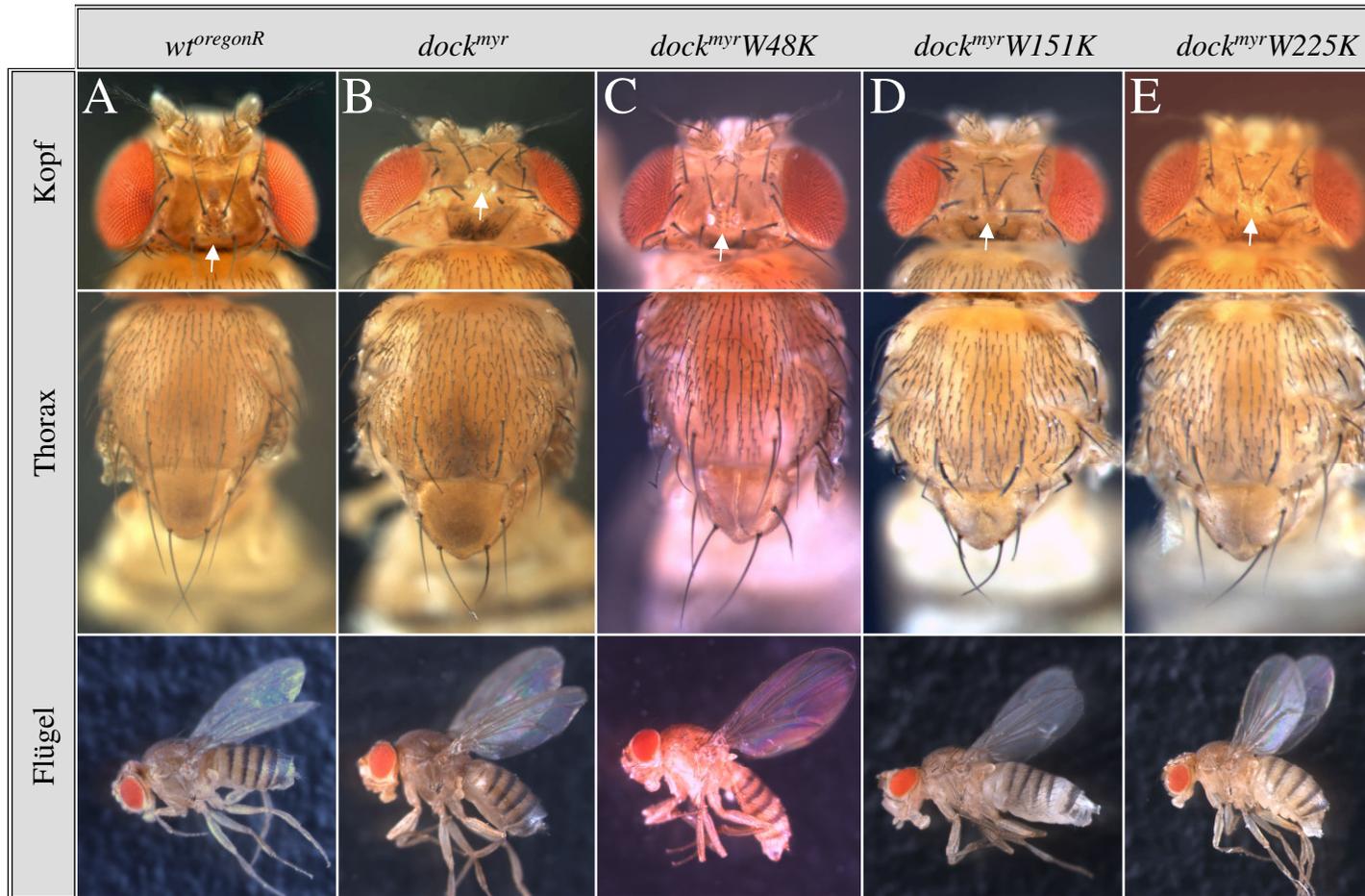


Abb. 27: Effekte der *dock*-Konstrukte, getrieben mit *scaGal4*, auf Kopf, Thorax und Flügel.

(A) Wildtyp, die Makrochaeten sind lang und gerade. Sie laufen spitz zu. (B-E) Unter Einfluss der Konstrukte ist die Anzahl und Morphologie der mechanosensorischen Borsten häufig gestört. Die Borsten sind dicker, dünner, kürzer, gebogen, gespalten und/oder geknickt. Der Effekt ist am schwächsten für *dock^{myr}W48K* (C). Die Flügel sind kürzer und nach unten gebogen, die Ränder leicht nach innen gebogen. Für das Konstrukt *dock^{myr}W48K* (C) konnte kein Flügelphänotyp beobachtet werden. Alle Bilder sind Projektionen. (A-E) Die Pfeile weisen auf die Ocellarborsten hin, deren Anzahl in *dock^{myr}* am stärksten reduziert ist.

3.2.3.2.3.4 und 3.2.3.2.3.5 werden die phänotypischen Veränderungen der Augen und Flügel genauer charakterisiert.

Insgesamt war schon zu Beginn der Analyse auffällig, dass sich das membranassoziierte vollständige DOCK bei Überexpression ähnlich verhielt wie die membranassoziierten Proteine, die eine unfunktionelle mittlere oder C-terminale SH3-Domäne aufwiesen. Die SH3-Domänen dienen der Bindung anderer Proteine, wie für WASP gezeigt (Bogdan, unveröffentlicht). Die ähnlichen Effekte lassen auf eine funktionelle Redundanz bei den hier betrachteten Entwicklungsprozessen schließen. Eine Ausnahme bildet das Protein DOCK^{myr}W48K, dessen N-terminale SH3-Domäne defekt ist. Diese Domäne bindet ABI und könnte damit für Prozesse wie die Flügelentwicklung sehr wichtig sein.

3.2.3.2.3.1 Analyse des Effektes auf die mechanosensorischen Borsten

Die Expression der Konstrukte in den Borstenvorläuferzellen mit Hilfe von *scaGal4* hat zum Teil drastische Auswirkungen auf die Entwicklung der Borsten. Um die morphologischen Defekte genauer charakterisieren zu können und die Unterschiede zwischen den Konstrukten genauer herauszuarbeiten, wurden jeweils 50 Fliegen, die heterozygot für Konstrukt und Treiber waren, auf vorkommende Phänotypen analysiert. Eine Ausnahme bildet das Konstrukt *dockSH3-middle*^{myr}, von dem nur 39 Fliegen untersucht werden konnten. Die Tabelle mit den genauen Prozentzahlen ist im Anhang XIII dargestellt. Zunächst wurde die Stärke der Phänotypen nach der Anzahl der betroffenen Borsten klassifiziert, wobei Kopf und Thorax unabhängig voneinander betrachtet wurden. Ein schwacher Phänotyp lag vor, wenn eine oder mehr Borsten auf dem Kopf oder Thorax betroffen waren. Ein mittlerer Phänotyp bezog sich auf drei oder mehr Borsten auf dem Kopf und fünf oder mehr Borsten auf dem Thorax und ein starker Phänotyp betraf fünf oder mehr Borsten am Kopf und acht oder mehr Borsten auf dem Thorax. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Treiberstamm allein ebenfalls die Borstenentwicklung beeinflusste und ein schwacher Phänotyp auch für die Nachkommen der Kreuzung *scaGal4/scaGal4* X *wt*^{OregonR} häufig war. Daher wurden zur Vereinfachung der Schemata die schwachen Phänotypen mit den Tieren ohne

Phänotyp zusammengefasst. Die Abbildungen 29 und 30 geben Auskunft über die Stärkeverteilung der Phänotypen aller sieben analysierten Konstrukte.

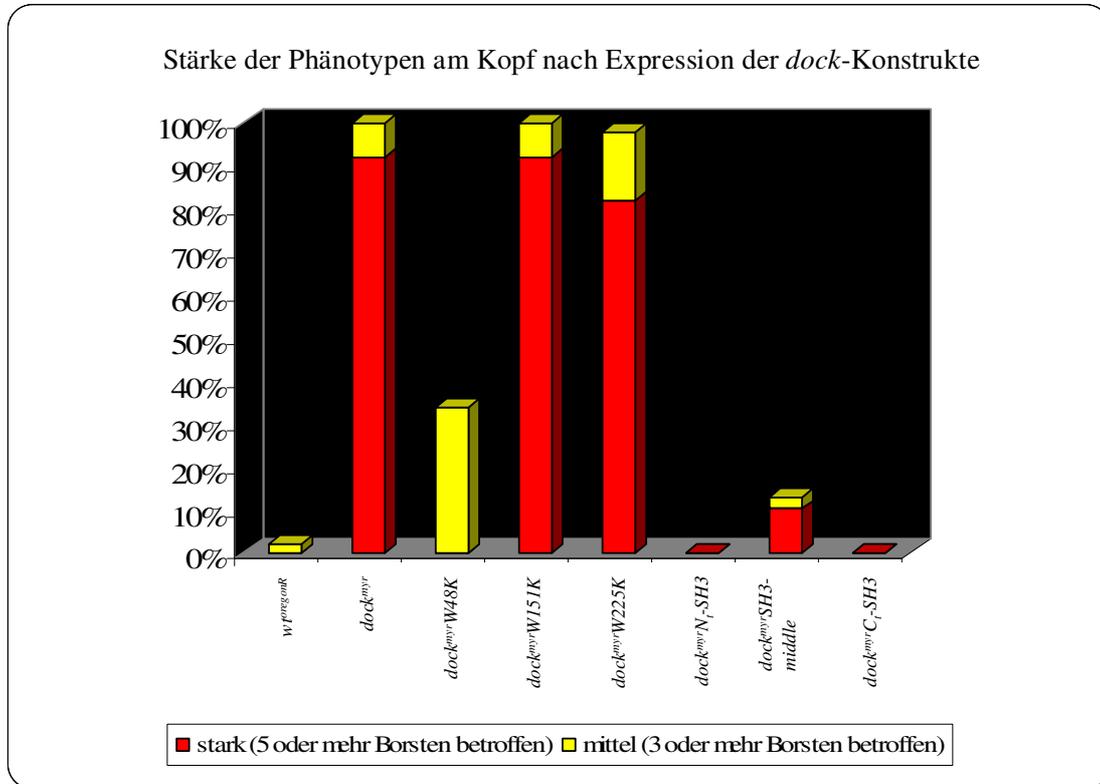


Abb. 29: Quantitative Erfassung der Borstenphänotypen nach Expression der *dock*-Konstrukte am Kopf. Eine Standardabweichung ist aufgrund der geringen Zahlen ausgewerteter Tiere nicht angegeben.

Die meisten Borsten sind bei Expression des Konstruktes *dock^{myr}W151K* betroffen, was möglicherweise die bei der Analyse der Flügelimaginalscheiben aufgefallene etwas erhöhte Expressionsstärke widerspiegelt. Deutlich weniger Borsten sind bei Expression des Konstruktes *dock^{myr}W48K* von morphologischen Veränderungen betroffen und sowohl für das Konstrukt *dockN_t-SH3^{myr}* als auch für *dockC_t-SH3^{myr}* konnte kein Effekt beobachtet werden. Das Konstrukt *dockSH3-middle^{myr}* zeigte in 13 % aller betrachteten Fliegen eine Veränderung der Kopfborsten und für 21 % der Fliegen mittlere und starke Phänotypen der thorakalen Borsten, die den unten beschriebenen Veränderungen zum Teil gleichen.

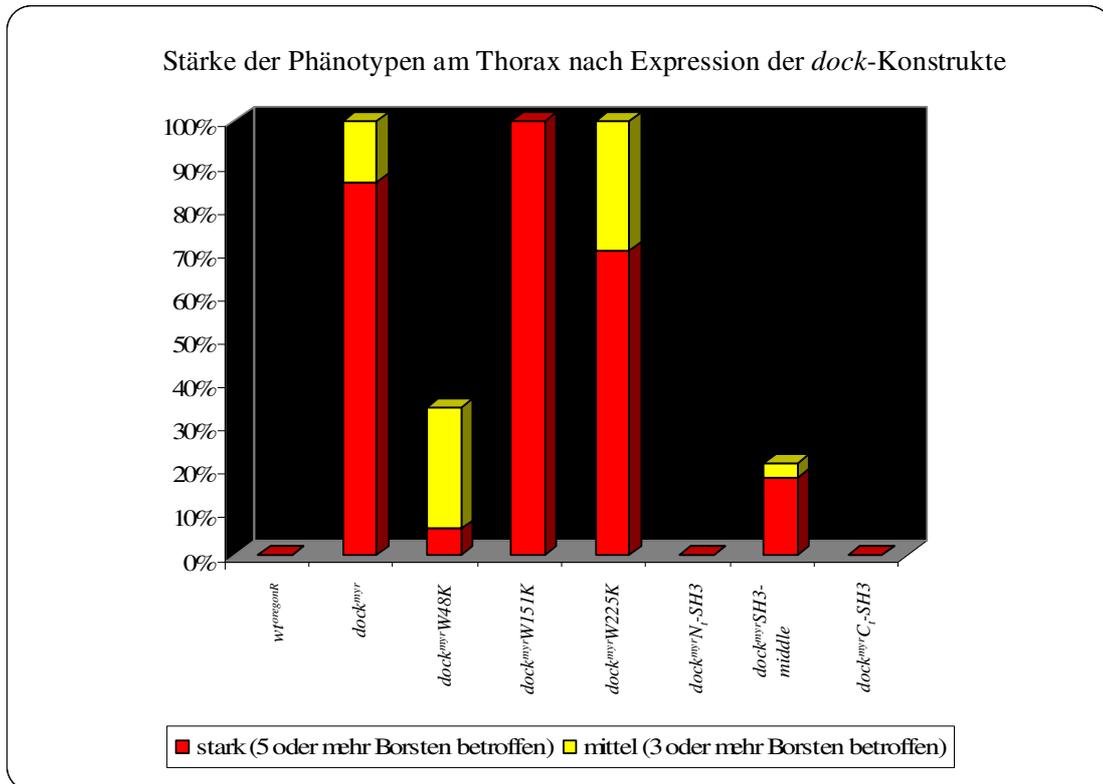


Abb. 30: Auszählungsergebnisse der Borstenphänotypen nach Expression der *dock*-Konstrukte auf dem Thorax. Eine Standardabweichung ist aufgrund der geringen Zahlen ausgewerteter Tiere nicht angegeben.

Unabhängig von der Menge der betroffenen Borsten ähneln sich die morphologischen Veränderungen, die die Expression der Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W48K*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* hervorruft, in auffallender Weise, was auf eine funktionelle Redundanz in diesen Prozessen hindeutet. Es treten kürzere, dickere, dünnere, gebogene, geknickte und gespaltene Makrochaeten auf, sowie Kombinationen dieser Merkmale. Die Stärke des Effektes variiert ebenfalls stark. Zudem ist auch nicht jedes Tier von allen genannten Veränderungen betroffen. Die Gesamtheit dieser Variationsmöglichkeiten machte eine genaue Betrachtung der 50 zufällig ausgewählten Fliegen notwendig, die in der Tabelle im Anhang XIII dargestellt ist.

Wie schon bei der Anzahl der betroffenen Borsten zeigte auch beim Auftreten der möglichen Phänotypen *dock^{myr}W151K* den stärksten Effekt, indem jede Fliege von einer Vielzahl an morphologischen Veränderungen betroffen war. Besonders kürzere, dickere und gespaltene Makrochaeten waren bei jeder Fliege in starker Ausprägung anzutreffen. Immerhin etwa die Hälfte der untersuchten Fliegen zeigte gebogene Borsten. Bei der Analyse der morphologischen Veränderungen fiel erneut auf, dass das

Konstrukt *dock^{myr}W48K* von den oben genannten Konstrukten den zahlenmäßig schwächsten Effekt zeigt. Vor allem dickere und gespaltene Borsten wurden seltener beobachtet.

Eine genaue Beschreibung der vorkommenden Phänotypen lässt sich anhand der Abb. 31 darstellen. Es wurden typische Borsten für das jeweilige Konstrukt ausgewählt, jedoch ähneln sich die Effekte so stark, dass die in der Abbildung für einzelne Konstrukte dargestellten Veränderungen auch bei Expression der anderen Konstrukte zu finden sind. Die Beschreibung wird daher allgemein gehalten.

Die in Abb. 31 A dargestellte wildtypische Makrochaete zeigt eine ebene Struktur mit gerade verlaufenden Längsrillen. Die Borste verjüngt sich zur Spitze hin gleichmäßig. Die Borsten der Fliegen, die heterozygot für eines der genannten Konstrukte und *scaGal4* sind, sind zum Teil deutlich dicker (Abb. 31 D) und erscheinen an der Spitze wie „abgebrochen“ (Abb. 31 C, D, E). Es treten deutlich sichtbare Querrillen auf, die zum Teil in Strukturen zusammenlaufen, die wie „Knoten“ aussehen (Abb. 31 B, D, E). Hinter einer solchen Verdickung geht die Längsrillenstruktur häufig verloren und die Borsten wirken „ausgefranst“ (Abb. 31 D, E). Ein solches Erscheinungsbild wurde bei der Klassifizierung als „gespalten“ gewertet. Es treten jedoch auch eindeutiger gespaltene Borsten auf, die an der Spitze, häufig auch bis zur Basis der Borste in zwei Teile aufgesplittet sind (Abb. 31 D). Zuweilen ist in solchen Fällen nicht einwandfrei erkennbar, ob es sich um eine gespaltene Borstenzelle oder um zwei Borsten handelt, die derselben Sockelzelle entspringen. Der Effekt der geknickten Borsten ist ebenfalls häufig (Daten gezeigt in Abb. 28 und 39). Für die beschriebenen Konstrukte sind auch Effekte auf die Mikrochaetenentwicklung nachweisbar. Eine Ausnahme bildet das Konstrukt *dock^{myr}W48K*, das keinen Einfluss auf die Ausbildung der Mikrochaeten hat (Abb. 31 H). Die Expression der Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* führt jedoch zu gespaltenen Mikrochaeten (Abb. 31 G, I, J), die in unterschiedlicher Anzahl auf dem Thorax vorkommen. Auch in diesem Zusammenhang stellt sich das Konstrukt *dock^{myr}W151K* als das stärkste dar. Die Menge der betroffenen Mikrochaeten variiert jedoch so stark, dass anhand der begrenzten Anzahl betrachteter Tiere keine Aussage über den prozentualen Anteil von gespaltenen Mikrochaeten getroffen werden konnte.

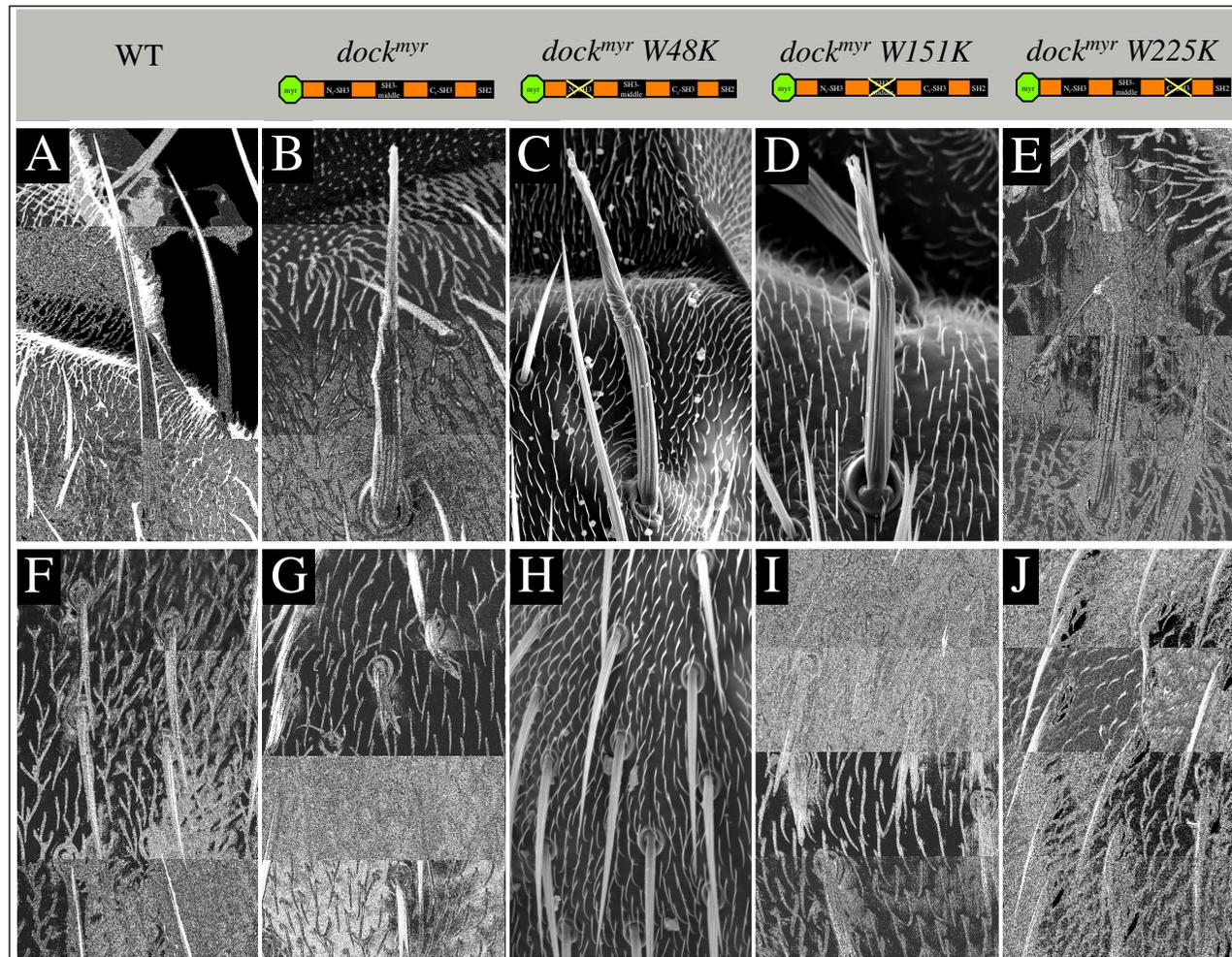


Abb. 30: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Phänotypen der thorakalen mechanosensorischen Borsten nach Expression der *dock*-Konstrukte mit *scaGal4*.

(A, F) Wildtyp, die Borsten sind gleichmäßig und laufen spitz zu. (B, C, D, E) Effekt auf die Makrochaeten. (G, H, I, J) Effekt auf die Mikrochaeten. (B-E) Die Makrochaeten sind morphologisch verändert, bilden „Knoten“ und zeigen Querrillen. Sie wirken wie abgebrochen und sind teilweise gespalten. (G, I, J) Die Mikrochaeten sind gespalten und verkürzt, teilweise auch gebogen. (H) Bei Expression des Konstruktes *dock^{myr}W48K* kann dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Der Phänotyp der durch Expression des *dockSH3-middle^{myr}*-Konstruktes in einem Teil der Fliegen erhalten wird, spiegelt die in Abb. 31 dargestellten Effekte nur zum Teil wieder. Es treten zwar auch kürzere, dünnere und gespaltene Makrochaeten auf, jedoch sind die gespaltenen Borsten weit weniger häufig und dickere Borsten wurden nicht gefunden (Daten nicht gezeigt). Es konnte auch kein Effekt dieses Konstruktes auf die Mikrochaetenentwicklung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ektopische Borsten finden sich bei Expression aller Konstrukte mit Ausnahme von *dock^{myr}W48K-V-I* und *dockN₁-SH3^{myr}* in deutlich größerer Menge als bei den Kontrolltieren der Kreuzung *scaGal4/scaGal4 X wt^{OregonR}*. Aufgrund der begrenzten Anzahl untersuchter Tiere wurde ein Unterschied erst dann als deutlich und signifikant angesehen, wenn er mehr als 10% betrug. Diese Regelung wurde auch für die Untersuchung der fehlenden Makrochaeten beibehalten.

Ein deutlicher Anstieg fehlender Makrochaeten im Vergleich zu den Kontrolltieren aus der Kreuzung *scaGal4/scaGal4 X wt^{OregonR}* konnte für die exprimierten Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* dokumentiert werden. Wie bei den Kontrolltieren war jedoch auch hier besonders häufig, aber nicht ausschließlich die untere Humeralborste betroffen. Bei Expression der Konstrukte *dock^{myr}W48K* und *dockN₁-SH3^{myr}* hingegen konnten weniger fehlende Makrochaeten verzeichnet werden. Inwiefern diese Daten auf einen Zusammenhang von DOCK mit den im Vorfeld der Borstenentwicklung getroffenen Zellschicksal-Entscheidungen, die die Menge der mechanosensorischen Borsten regulieren, schließen lassen, war zu diesem Zeitpunkt nicht erkennbar und sollte noch untersucht werden.

3.2.3.2.3.2 Analyse des Effektes auf die frühe Borstenentwicklung

Um genauere Aussagen über den Zeitpunkt der Einflussnahme der Konstrukte machen zu können, wurde der Effekt in einem früheren Stadium der Borstenentwicklung untersucht. Da die Effekte der Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W48K*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* auf die Makrochaeten-Morphologie untereinander wie beschrieben recht ähnlich sind, wurden stellvertretend für die Gruppe Tiere untersucht, die heterozygot für *dock^{myr}W151K* und den Treiber *scaGal4* waren. In einem Zeitfenster zwischen 32 und 48 Stunden nach Beginn des Pupariums lagern sich longitudinale F-AKTIN-Bündel

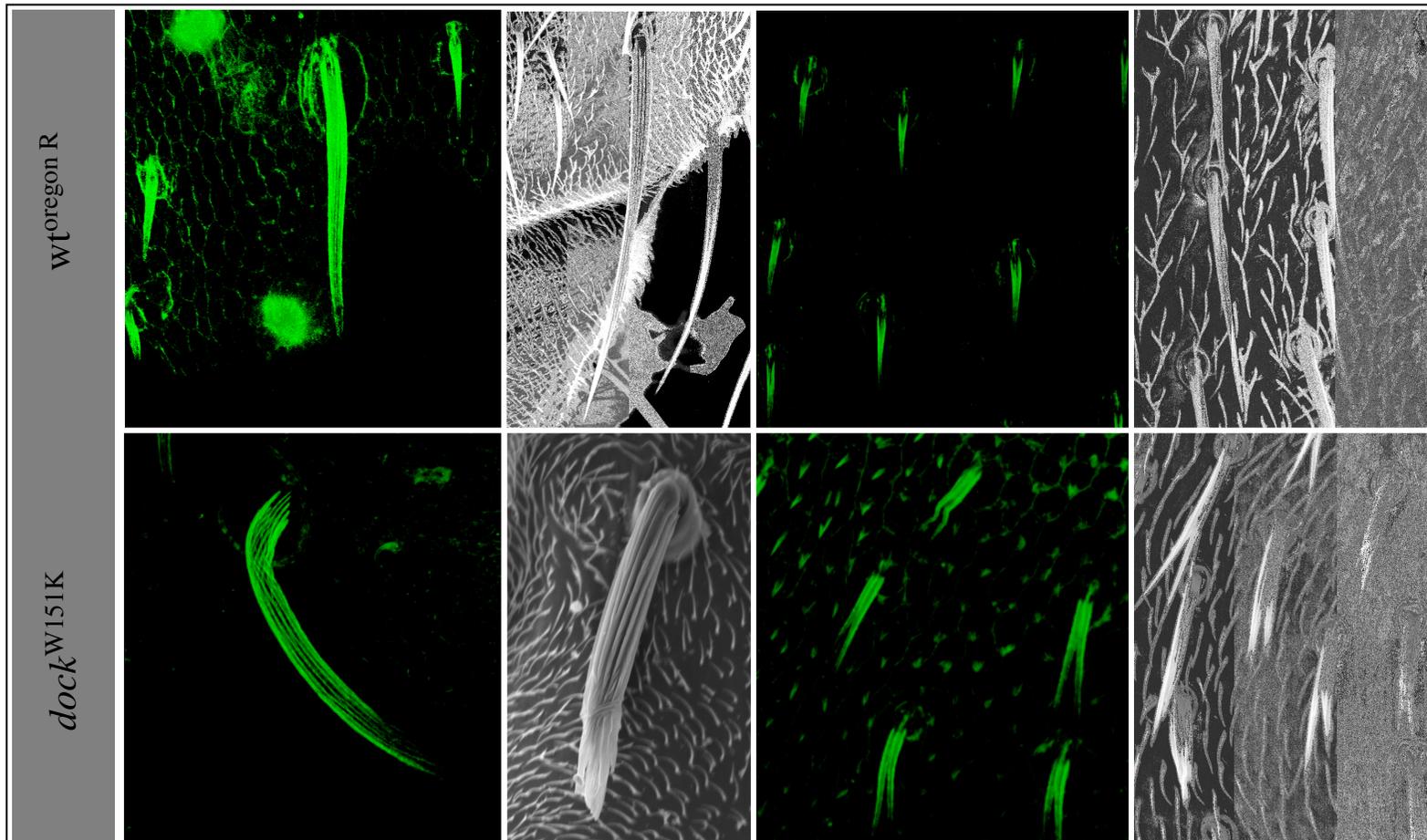


Abb. 31: Die Beeinflussung der frühen Borstenentwicklung durch die Expression des Konstruktes *dock^{myrW151K}*.

Aktinfärbungen mit Phalloidin im Stadium 40 APF und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der adulten Borsten.

Das Konstrukt *dock^{myrW151K}* steht stellvertretend für die ähnlichen Effekte aller *dock*-Konstrukte mit Ausnahme der einzelnen SH3-Domänen und betreffend die Mikrochaeten *dock^{myrW48K}* (Erläuterungen siehe Text). Morphologische Veränderungen der Borsten im Vergleich zum Wildtyp sind bereits im AKTIN-Stadium der Borsten zu erkennen. Auch die Mikrochaeten zeigen bereits die Aufspaltung, die in den adulten Fliegen sehr penetrant ist.

in einem Fortsatz der Borstenzelle ein und werden verlängert. Durch Färbungen mit Phalloidin können die entstehenden Borsten anhand des eingelagerten AKTINS sichtbar gemacht werden (Abb. 32). In der oberen Reihe des Bildes ist die Entwicklung wildtypischer Makro- und Mikrochaeten dargestellt. Die untere Reihe zeigt eine vergleichbare Situation unter Einfluss des Konstruktes *dock^{myr}W151K*. Die Bilder von adulten Borsten wurden so gewählt, dass sie die in der Puppe observierten Phänotypen widerspiegeln, um die direkte Vergleichbarkeit des AKTIN-Phänotyps mit dem späteren Borstenphänotyp zu verdeutlichen. Die Makrochaete im Wildtyp zeigt schon im AKTIN-Stadium eine deutliche Verjüngung zur Spitze hin, die bei Expression des Konstruktes nicht zu sehen ist. Eine aus einer ähnlichen AKTIN-Verteilung resultierende Borste hat keine richtige Spitze, sondern wirkt „abgebrochen“. Bei Betrachtung der Mikrochaeten wird deutlich, dass bei Expression des Konstruktes im *scaGal4*-Muster schon im AKTIN-Stadium eine Spaltung der Borsten auftritt. Nach diesen Untersuchungen konnte als gesichert angesehen werden, dass die Expression der Konstrukte bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Borstenentwicklung in die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts eingreift.

3.2.3.2.3.3 Analyse des Effektes auf die thorakalen Haare

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Borsten brachte einen weiteren Effekt der Expression der Konstrukte *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* ans Licht, der bei lichtmikroskopischer Betrachtungsweise nicht erkennbar war. Der gesamte Körper der Fliege ist von feinen Haaren bedeckt, die anders als die mechanosensorischen Borsten kutikuläre Anhänge sind. Auch ihre Ausbildung wird vom AKTIN-Zytoskelett gesteuert und bei Phalloidinfärbungen an Puppen sind sie als Punkte mit hoher AKTIN-Dichte erkennbar (Abb. 32). Die Ausbildung dieser Haare ist in für Konstrukt und Treiber heterozygoten Fliegen gestört (Abb. 31 und 33). Es treten Bereiche mit einer Vielzahl von Haaren in direkter Nachbarschaft zueinander auf (Abb. 33 A, B), was beim Wildtyp nicht zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Eine noch größere Auflösung zeigt morphologische Veränderungen der Haare (Abb. 33 C). Gespaltene, gebogene und geborstene Haare wurden gefunden (Abb. 33 B, C). Da diese Haare durch Ansammlung von AKTIN gebildet werden (Guild *et al.*, 2005), liegt die

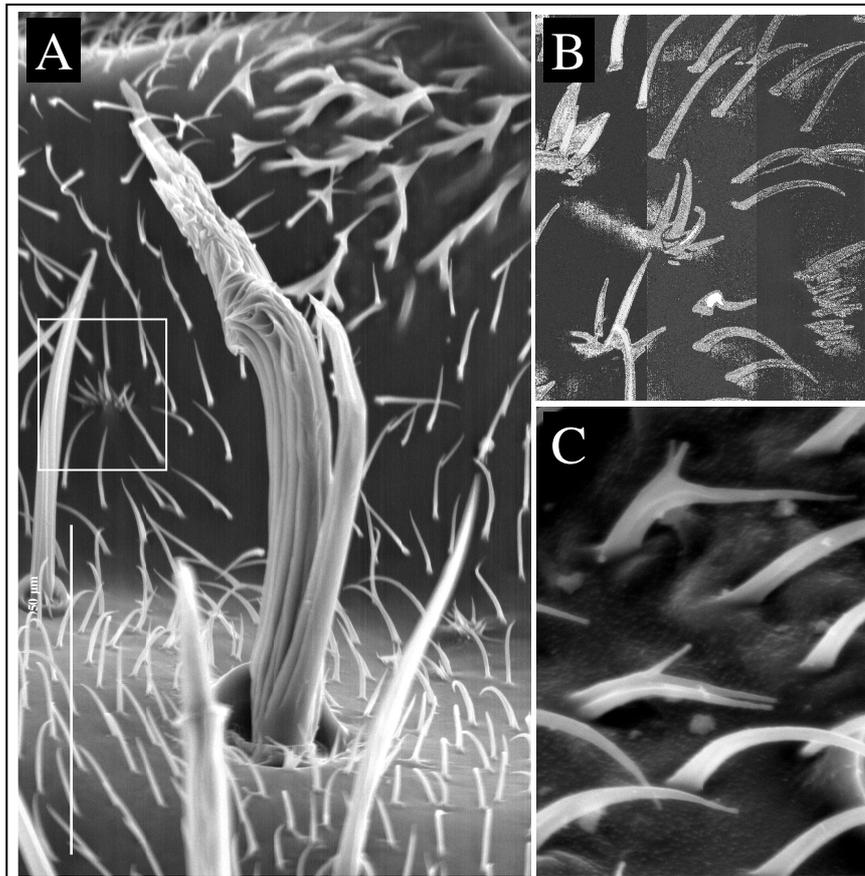


Abb. 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Haare auf dem Thorax heterozygoter *scaGal4; dock^{myr}W151K*-Fliegen.

(A) Die Haare zwischen den mechanosensorischen Borsten zeigen einen ungewöhnlichen Phänotyp. Es treten an manchen Stellen viele Haare nebeneinander auf, wie die Vergrößerung (B) verdeutlicht. Zudem ist die Morphologie gestört, die Haare sind gebogen oder, wie Abbildung (C) zeigt, gespalten.

Vermutung nahe, die Expression könnte eine Erhöhung des F-AKTIN-Levels zur Folge haben und damit F-AKTIN-Bildung induzieren. Der beobachtete Phänotyp spiegelt damit direkt die erhöhte AKTIN-Polymerisation wieder.

3.2.3.2.3.4 Analyse des Effektes auf die Flügel

Wie bereits erwähnt, zeigen die Tiere, die heterozygot für den Treiber *scaGal4* und die Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W151K* oder *dock^{myr}W225K* sind, einen Phänotyp der Flügelentwicklung. Da sich die Phänotypen bei Expression der drei genannten Konstrukte gleichen, wird repräsentativ das Konstrukt *dock^{myr}* genauer vorgestellt. Die Abb. 34 zeigt die analysierten Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp. Die Flügel sind abwärts und an den Rändern nach innen gebogen (Abb. 34 A). Sie scheinen in ihrer Größe reduziert zu sein (Abb. 34 A). Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigt eine Verdickung der L3-Vene und teilweise findet sich zusätzliches Venengewebe an ektopischen Positionen (Abb. 34 B Pfeilkopf). Zudem findet sich eine erhöhte Anzahl mechanosensorischer Sinnesorgane des Flügels, der so genannten campaniformen Sensillen. Ein wildtypischer Flügel weist entlang der L3-Flügelvene normalerweise 3 campaniforme Sensillen auf. Die *dock^{myr}*-Fliegen zeigen eine zusätzliche campaniforme Sensille (Abb. 34 B Pfeile). Auffallend ist die Lage der Sensillen, die sich nicht wie beim Wildtyp auf oder an der Vene befinden, sondern zum Teil frei im ersten posterioren Zell-Kompartiment zu finden sind (Abb. 34 B, C). Eine Auszählung von mindestens 10 Flügeln pro Konstrukt zeigte den deutlichsten Effekt für *dock^{myr}*. 82 % wiesen eine zusätzliche campaniforme Sensille auf. Bei 91 % der Flügel kamen Sensillen an ektopischen Positionen vor, die nicht mit der L3-Vene assoziiert vorlagen. Auch diese phänotypischen Veränderungen können als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von DOCK an Zellschicksal-entscheidungen verstanden werden.

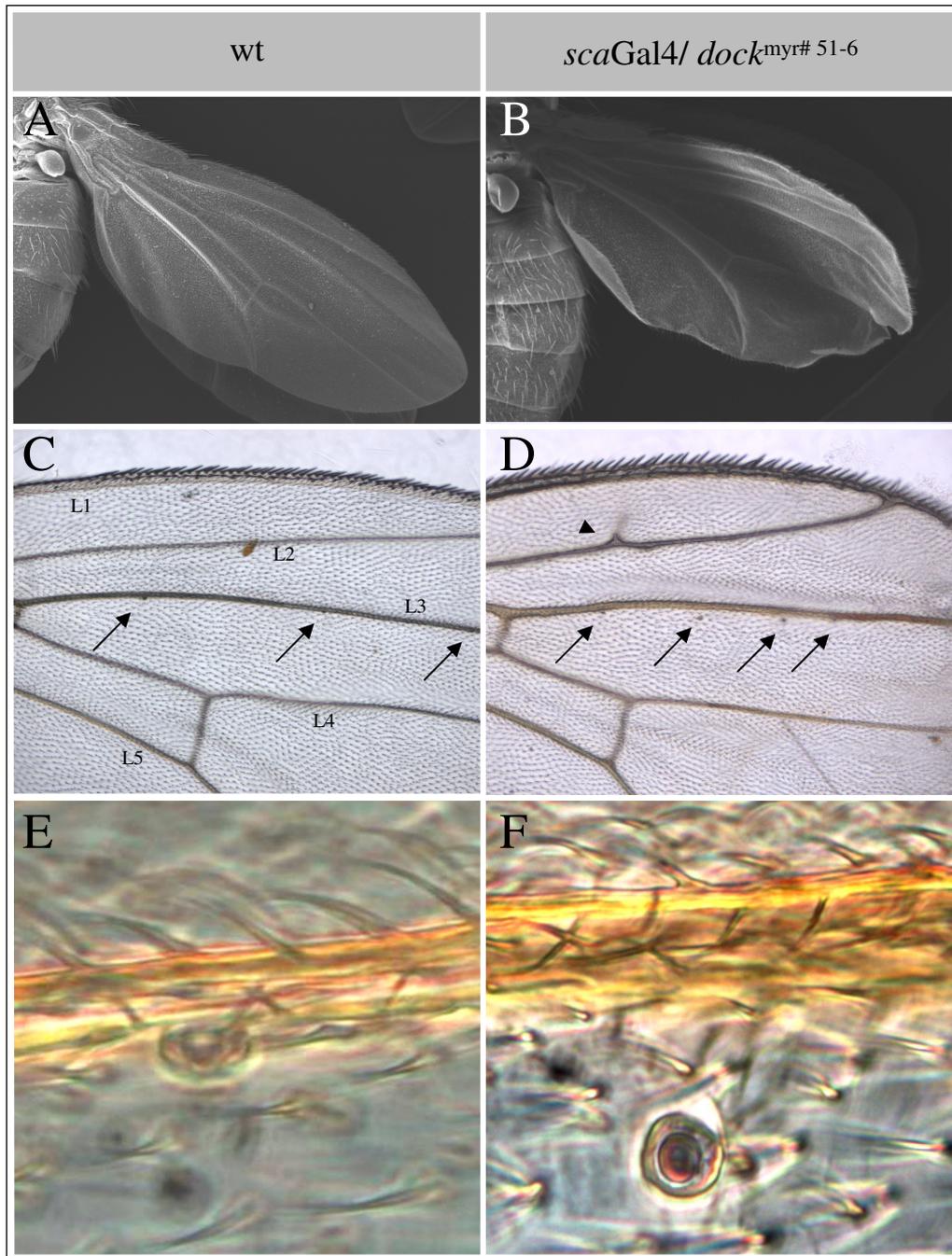


Abb. 33: Flügelphänotyp des *dock^{myr}*-Konstruktes, getrieben mit *scaGal4*.

(A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme ganzer Flügel. Deutlich erkennbar ist die gebogene, verkürzte Form mit den „aufgerollten“ Flügelrändern der *scaGal4/ dock^{myr}*-Fliegen. (B, C) Flügelpräparationen in *Hoyers Medium*/Milchsäure (1:1). (B) In der Aufsicht sind die Positionen der campaniformen Sensillen zu erkennen (Pfeile). Die Expression des *dock^{myr}*-Konstruktes hat ectopische campaniforme Sensillen und ectopisches Venengewebe (Pfeilkopf) zur Folge. Auch die verdickte Flügelvene L3 ist zu erkennen. (C) Die Sensillen der *scaGal4/ dock^{myr}*-Fliegen befinden sich häufig nicht auf den Flügelvenen, sondern an ectopischen Positionen ersten posterioren Zell-Kompartiment.

3.2.3.2.3.5 Analyse des Effektes auf die Augen

Die Expression der dock-Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W48K*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* beeinflusst neben den bereits beschriebenen Entwicklungsprozessen auch die Augenentwicklung. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigt leichte Organisationsdefekte (Abb. 35). In der wildtypischen Situation sind die Einzelommatidien in einem hexagonalen, regelmäßigen Muster angeordnet und auch die Anordnung der Borsten folgt einer strengen Ordnung. Ein Einzelommatidium ist von drei Interommatidialborsten umgeben, wobei immer eine „Ecke“ des Sechsecks zwischen den Borsten frei bleibt. So entstehen Reihen von Interommatidialborsten, die besonders gut sichtbar sind, wenn man das Auge entlang der anterior-posterioren oder dorsal-ventralen Achse betrachtet (Abb. 35, erste Spalte). Eine Aufsicht in höherer Auflösung auf ein Ommatidiencluster ermöglicht die genaue Analyse des Musters (Abb. 35, zweite Spalte).

Die für die oben genannten Konstrukte observierten Effekte gleichen sich sehr. Die ordentlichen Reihen der Interommatidialborsten sind gestört. Die Augen weisen Borsten an ektopischen Positionen auf, während an anderen Positionen Borsten fehlen (Abb. 35). An manchen Positionen sind zwei Borsten anstelle von einer zu finden, wobei unklar bleibt, ob die Borste in ihrer Position „verrutscht“ ist oder eine zusätzliche Borste gebildet wurde. Für das Konstrukt *dock^{myr}W225K* konnten auch morphologische Veränderungen der Interommatidialborsten beobachtet werden. Es traten in seltenen Fällen gespaltene Interommatidialborsten auf (Abb. 35 Pfeil).

3.2.3.2.3.6 Dosiseffekt des *dock^{myr}#51-6*-Konstruktes

Bei der Etablierung des *dock^{myr}#51-6*-Konstruktes zeigte sich, dass es sich um eine Doppelinsertion auf unterschiedlichen Chromosomen handelte. Die Expression von zwei Kopien des Konstruktes, eine auf dem zweiten Chromosom und eine auf dem dritten Chromosom, ergab einen deutlichen Dosiseffekt. Der beschriebene Phänotyp wurde durch die zweite Kopie drastisch verstärkt, wie Abb. 36 belegt. Die mechanosensorischen Borsten auf dem Kopf fehlten teilweise. An anderer Stelle sind zu viele Borsten zu erkennen (Abb. 36). Zudem kommt es zur Bildung von

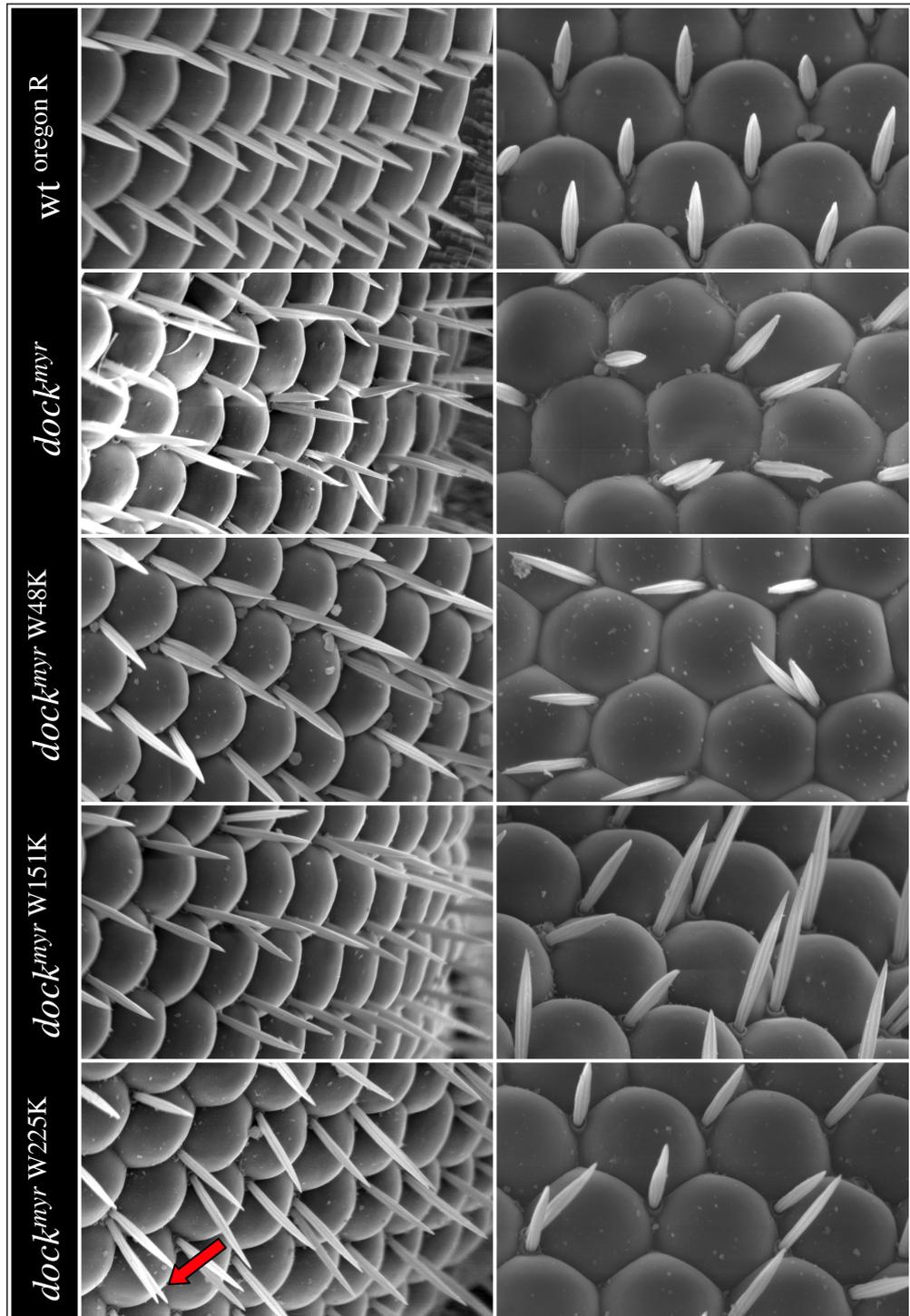


Abb. 34: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Augenphänotypen nach Expression verschiedener *dock^{myr}*-Konstrukte mit *scaGal4*.

Allen gezeigten Phänotypen ist gemein, dass sich Interommatidialborsten an ektopischen Positionen befinden. Teilweise scheinen sie dupliziert zu sein. An anderen Positionen fehlen dagegen Interommatidialborsten. Durch diese Effekte ist die Ausbildung der „Reihen“ interommatidialer Borsten gestört und unterbrochen. Der Pfeil zeigt eine gesplante Interommatidialborste an. Die Einzelommatidien zeigen keine veränderte Morphologie.

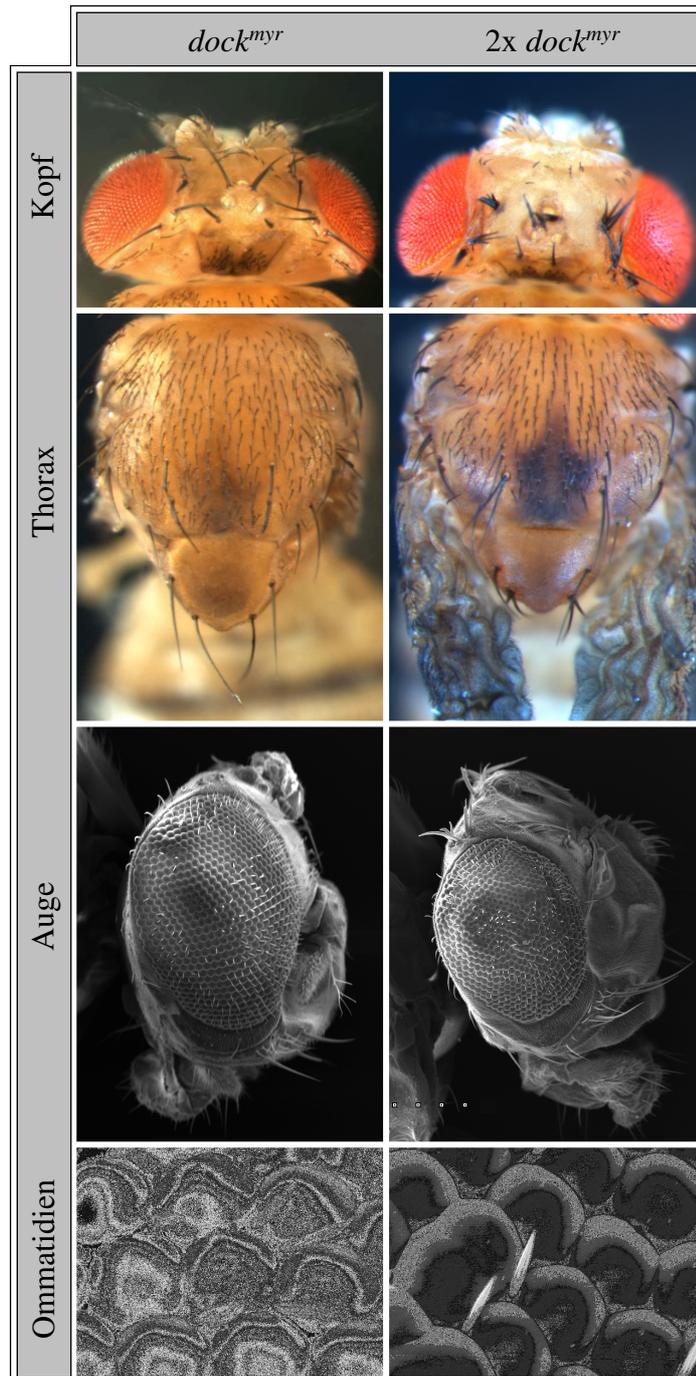


Abb. 35: Dosiseffekt des Konstruktes *dock^{myr}#51-6* bei 25 °C, getrieben mit *scaGal4*.

Die Bilder von Kopf und Thorax sind Projektionen, die Bilder von Auge und Ommatidien rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Zwei Kopien des Konstruktes erwirken eine deutliche Verstärkung des Phänotyps. Die Borsten sind sehr dick und gespalten, es entstehen „Borstencuster“, die sich zum Teil auch an ektopischen Positionen befinden. In anderen Bereichen von Kopf und Thorax fehlen Borsten. Die Flügel kommen bei manchen Fliegen nicht zur Entfaltung. Die Augen sind stark rau und etwas verkleinert. Eine genaue Aufsicht auf die Ommatidien zeigt nur noch wenige Interommatidialborsten an ihren spezifischen Positionen. Zudem treten „fusionierte“ Ommatidien auf.

„Borstenclustern“, Stellen, an denen sehr viele Borsten zu sehen sind und nicht eindeutig geklärt werden konnte, aus wie vielen einzelnen Sinnesorganen diese Ansammlungen bestehen. Zudem ist die Morphologie der einzelnen Borsten sehr stark verändert. Die Borsten sind sehr kurz, wesentlich dicker und, sofern die Ansammlungen nicht aus sehr vielen Borsten bestehen auch stark gespalten. Der Eindruck der „abgebrochenen“ Borsten ist ebenfalls verstärkt. Auch auf dem Thorax ist der Makrochaetenphänotyp deutlich verstärkt (Abb. 36). Neben ektopischen Borsten treten häufig bis zur Basis gespaltene Borsten auf, auch auf dem Scutellum, einer von den Borsteneffekten der einfachen Kopie nicht sehr häufig betroffenen Region. Es konnte nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob es sich möglicherweise auch um ektopische Borsten handelt. Die Betrachtung des Auges zeigt ebenso eine Verstärkung des Phänotyps, der bei Expression einer Kopie beobachtet werden kann (Abb. 36). Das Auge ist etwas verkleinert und sehr stark rau. Die Ausbildung der ebenmäßigen Struktur ist gestört. Eine höhere Auflösung zeigt das Fehlen der Interommatidialborsten in Teilen des Auges. Zudem kann eine Fusion der Ommatidien beobachtet werden (Abb. 36). Die Tiere sind außerdem sehr schwach und haben starke motorische Schwierigkeiten, da sie nur zu sehr eingeschränkter Bewegung fähig sind. Viele Tiere schaffen es nicht, ihre Flügel zu entfalten, und diejenigen, denen es gelingt, zeigen einen verstärkten Flügelphänotyp. Die Flügel sind noch stärker gebogen und wirken „zerknittert“ (Daten nicht gezeigt).

3.2.3.2.3.7 Analyse gespaltener Borsten

Während der bisherigen Untersuchungen der phänotypischen Auswirkungen der *dock*-Konstrukte auf die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten wurde die Frage aufgeworfen, ob DOCK auch an der Determination des Zellschicksals beteiligt ist. Die Abb. 37 stellt diese Frage anhand des Vergleichs gefundener Phänotypen dar. Da sich die Phänotypen nach Expression der Konstrukte *dock^{myr}*, *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* sehr gleichen, wurden in dieser Darstellung Borsten verschiedener Genotypen zur Verdeutlichung nebeneinander gestellt. Im Stadium der AKTIN-Einlagerung der entwickelnden Borste ebenso wie anhand der adulten Borste können sowohl morphologische Veränderungen (Abb. 37 A-F) als auch Veränderungen der

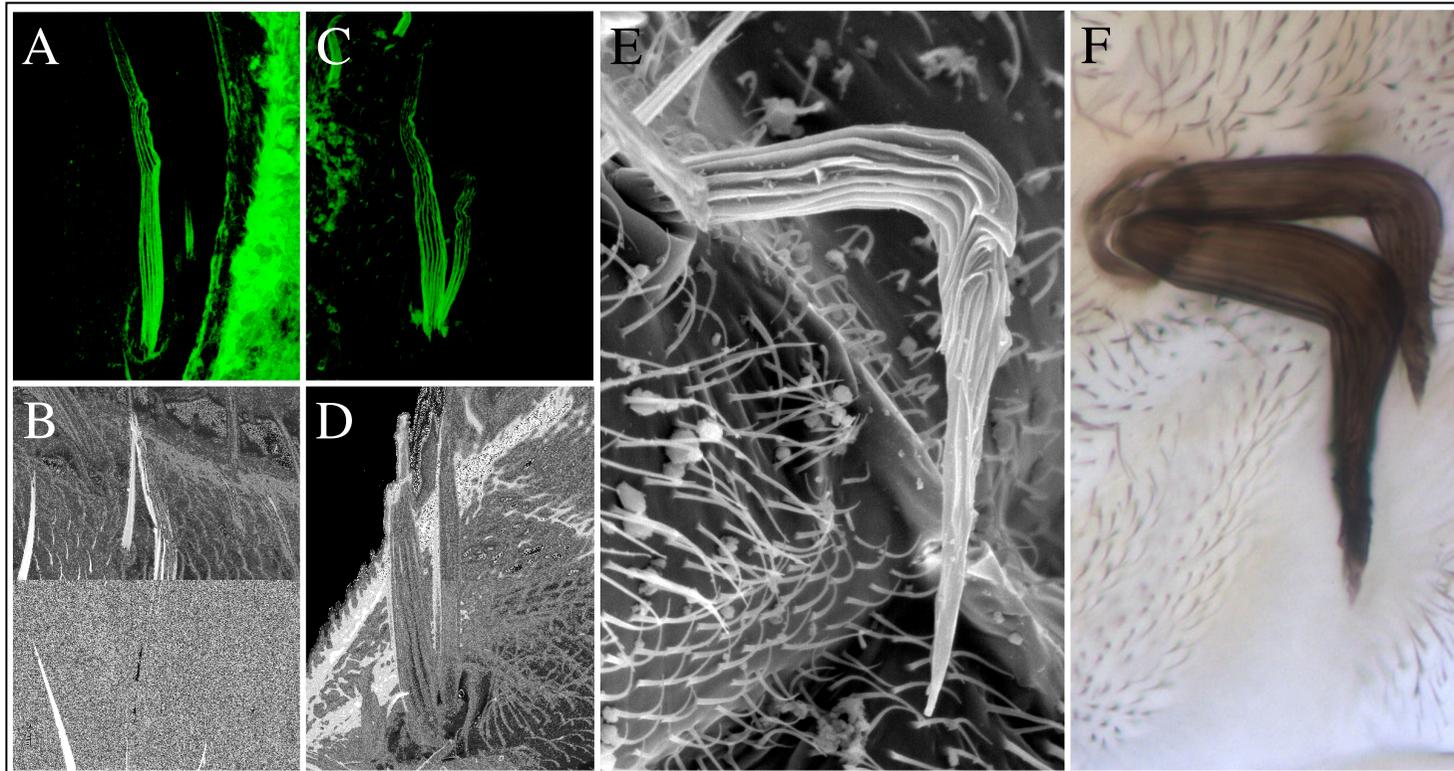


Abb. 36: Analyse gespalteener Makrochaeten.

(A, C) AKTIN-Färbungen mit Phalloidin an Puppen 40 h APF. (B, D, E) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mechanosensorischer Borsten der adulten Fliege. (F) Lichtmikroskopische Aufnahmen als Projektion von Borsten der adulten Fliege. Aufgrund der ähnlichen Effekte mehrerer *dock*-Konstrukte sind verschiedene Konstrukte nebeneinandergestellt (Erläuterungen siehe Text). (A, C) *dock^{myr}*. (B, E, F) *dock^{myr} W151K*. (D) 2 Kopien *dock^{myr}*. (A) Bereits im AKTIN-Stadium der Borstenentwicklung können morphologische Effekte des Konstruktes *dock^{myr}* sichtbar gemacht werden. Daneben treten Borsten auf, die so tief gespalten sind, dass möglicherweise zwei Borsten an dieser Stelle vorliegen (C). Die Borsten adulter Fliegen spiegeln diese Effekte wieder (B, D). (E) Es können geknickte Borsten auftreten, deren Querrillen und verwinkelte Strukturen die Fehlorganisation des AKTIN-Zytoskeletts erahnen lassen. (F) Solche morphologischen Veränderungen können auch parallel zu möglichen Duplikationen von Borsten auftreten.

Anzahl von Borstenzellen (Abb. 37 C, D, F) beobachtet werden, die nicht nur durch einfache Spaltung erklärbar erscheinen. So wirken manchmal die Borstenzellen unabhängig, die Sockelzellen scheinen jedoch „verschmolzen“ zu sein und nur einen Sockel auszubilden (Abb. 37 F). Es wäre jedoch auch möglich, dass die beobachteten Borsten nur eine Sockelzelle haben. Bei Borstenzellen, die sehr dicht zusammenstehen, bleibt jedoch die Frage offen, ob es sich um unabhängige vollständige Sinnesorgane handelt, oder aber möglicherweise eine Fehldetermination stattgefunden hat und Zellen ein verändertes Zellschicksal angenommen haben.

Bei der Betrachtung der Makrochaeten des Kopfes von Tieren, die zwei Kopien *dock^{myr}#51-6* unter der Kontrolle von einer Kopie *scaGal4* exprimieren, stehen diese Effekte sehr deutlich nebeneinander (Abb. 38). Es treten Borsten auf, die morphologisch sehr stark verändert sind. Sie sind kürzer und extrem verdickt. An der Spitze spalten sie sich auf (Abb. 38 A, B). Gehen solche Spaltungen bis zur Basis der Borste, ist nicht eindeutig ersichtlich, ob es sich möglicherweise um eine ektopische Borste handelt (Abb. 38 A, C). Daneben können ektopische Borsten gefunden werden, die wesentlich kürzer sind und „abgebrochen“ aussehen, aber vermutlich verschiedene sensorische Organe darstellen (Abb. 38 A, D). Betrachtet man den Kopf solcher Tiere während der pupalen Entwicklung, sind ähnliche Veränderungen bereits erkennbar (Abb. 38 E, F, G). Die Expression von *Suppressor-of-hairless-GFP*, das die Sockelzellen markiert, zeigt auch eine vermehrte Anzahl von Sockelzellen in solchen Bereichen (Abb. 38 G).

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die erhöhte Anzahl der beobachteten Sinnesorgane mit einer erhöhten Anzahl der Vorläuferzellen (*SOPs*) einhergeht, wurde eine Färbung mit dem Antikörper α -HINDSIGHT (HNT) an Flügelimaginalscheiben vorgenommen, der alle *SOP*-Zellen färbt (Abb. 39 A, B). Eine Gegenfärbung mit α -DOCK offenbarte das *scaGal4*-Expressionsmuster. Für die Färbung wurden *L3*-Larven verwendet, die heterozygot für *scaGal4* waren und zwei Kopien des Konstruktes *dock^{myr}#51-6* trugen. Nicht in allen Flügelimaginalscheiben konnte ein Effekt des Konstruktes beobachtet werden. Abb. 39 A, B zeigt jedoch eine erhöhte Anzahl von *SOP*-Zellen in der Region, die für die Ausbildung der Notopleuralborsten verantwortlich ist. Abb. 39 C stellt ein Detail dieser Region der Abb. 39 B dar. Es ist

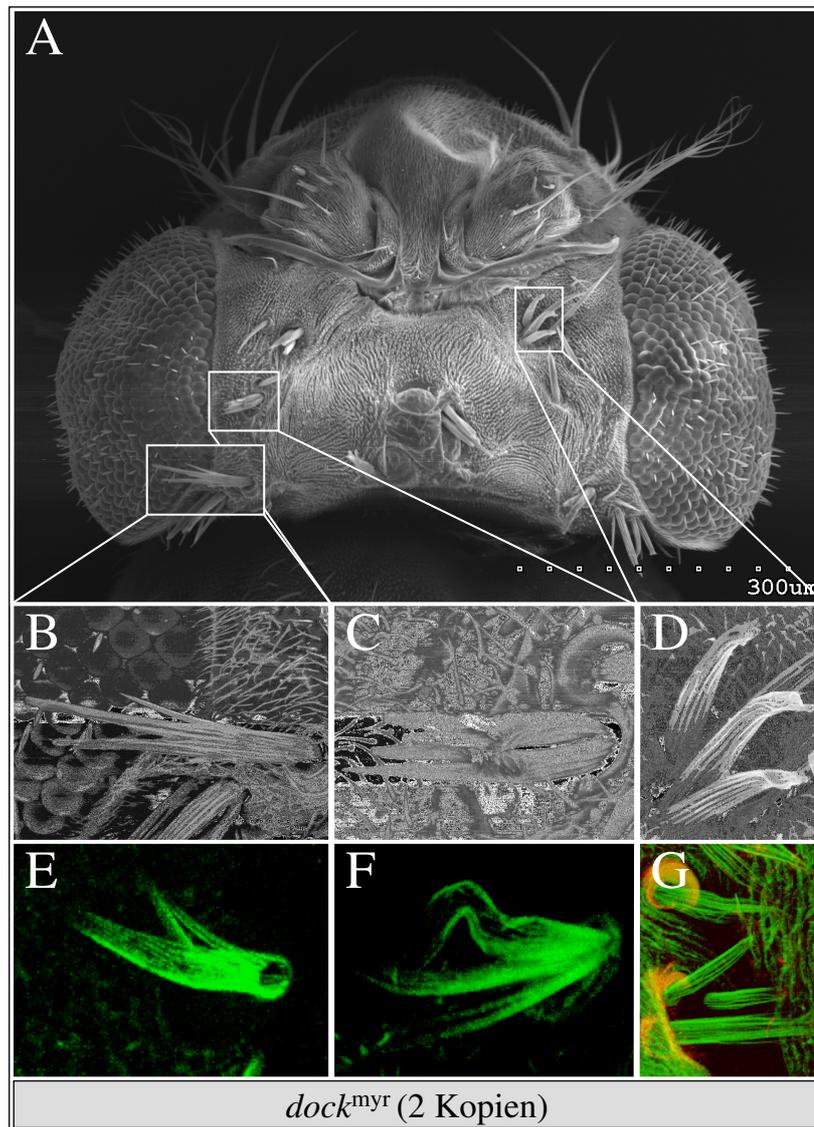


Abb. 37: Verschiedene Prozesse innerhalb der Entwicklung mechanosensorischer Borsten werden durch die Expression von zwei Kopien *dock^{myr}* durch *scaGal4* beeinflusst.

(A-D) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des adulten Fliegenkopfes. (E-G) AKTIN-Färbungen mit Phalloidin an Puppen 40 h APF. Die Abbildungen sind Projektionen. (G) Zusätzlich sind die Sockelzellen mit *Su(H)*-GFP markiert. (A) Dorsale Aufsicht eines Fliegenkopfes. (B-D) Vergrößerungen jeweiliger Borsten des Kopfes. (B) Borsten dieser Fliegen können morphologische Veränderungen wie Spaltung zeigen, die auch in früheren Entwicklungsstadien solcher Borsten bereits ersichtlich sind (E). (C) Daneben treten sehr dicke Borsten auf, die bis zur Basis gespalten sind und daher möglicherweise aus zwei dicht nebeneinander liegenden Einzelborsten bestehen. Auch solche Effekte können in Puppenstadien bereits beobachtet werden (F). (D) Der dritte beobachtete Phänotyp der mechanosensorischen Borsten sind die ektopischen Borsten, die ebenfalls durch AKTIN-Färbung im Puppenstadium sichtbar gemacht werden können (G).

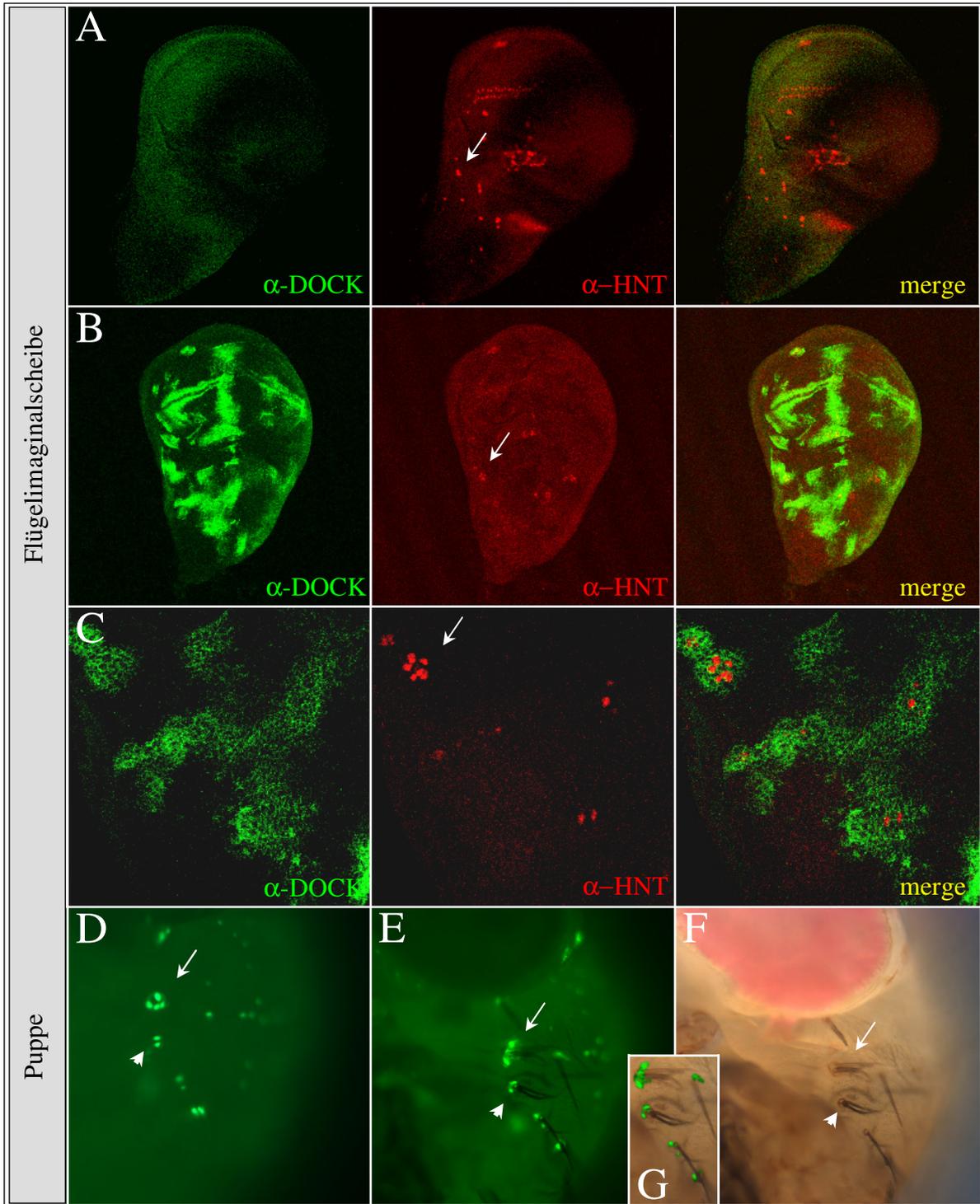


Abb. 38: Der Effekt von zwei Kopien *dock^{myr}*, getrieben mit *scaGal4*, auf die Anzahl der *sensory organ precursor* (*SOP*)-Zellen.

(A-C) Präparationen von Flügelimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvenstadiums. (D-F) Präparationen von Puppen. (G) Projektion der Bilder E und F. Alle Bilder sind Projektionen. (A, B, C) Antikörperfärbungen mit α -DOCK und α -HNT mit anschließender Fluoreszenzdetektion. Der Pfeil zeigt die Vorläufer der Notopleuralborsten (A) Im Wildtyp erkennt man die Lage der *SOP*-Zellen, die Vorläufer der adulten Borsten sind. (B) Bei Expression von zwei Kopien *dock^{myr}* durch *scaGal4* ist ein „cluster“ von *SOP*-Zellen an der Stelle sichtbar, deren *SOPs* die Notopleuralborsten bilden. (C) zeigt eine höhere Vergrößerung der „cluster“ aus (B). Das „cluster“ liegt innerhalb der *scaGal4*-Expressionsdomäne. (D) Betrachtet man die Region der Notopleuralborsten etwa 40 h APF unter zusätzlicher Expression von *Su (H)-GFP* zur Markierung der Sockelzellen, können statt der üblichen 2 Sockelzellen ebenfalls „cluster“ ausgemacht werden (Pfeil). Im Fall dieses Tieres können vier Sockelzellen erkannt werden. (E, F, G) Das gleiche Tier wie in (D) zeigt gegen Ende der pupalen Entwicklung drei Borsten an gleicher Stelle. Der Pfeilkopf markiert eine Stelle, an der zwei Sockelzellen zu sehen sind. Gegen Ende der pupalen Entwicklung ist jedoch nur eine bis zur Basis gespaltene Borste zu erkennen.

eine normale Anzahl der *SOPs* erkennbar, die die Dorsozentralborsten bilden. In der Region der Notopleuralborsten ist jedoch ein ganzes „cluster“ von *SOPs* sichtbar. Eine Analyse dieser Region in Puppen erbrachte häufig eine erhöhte Anzahl von Sockelzellen in diesem Bereich (Abb. 39 C), die hier mit *Suppressor of hairless*-GFP markiert wurden. Wurde dieselbe Puppe in ihrer Entwicklung weiterverfolgt, zeigte sich auch ein „cluster“ von Borsten an gleicher Stelle. An der Stelle, die in der frühen Puppe ganz deutlich erkennbar vier Sockelzellen aufweist, scheinen sich gegen Ende der pupalen Entwicklung jedoch nur drei Borsten zu bilden. Deutlich erkennbar ist auch, dass eine Borste, die wie bis zur Basis gespalten aussieht und die bei Betrachtung der fast adulten Fliege nur eine Sockelzelle zu haben scheint, durch die Markierung eine zweite Sockelzelle offenbart (Abb. 39 E (Pfeil), F, G). Auch hier ist möglich, dass die beiden Sockelzellen einen „verschmolzenen“ Sockel aufweisen. Inwieweit das für die Mehrzahl der bis zur Basis gespaltenen Borsten zutrifft, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass eine erhöhte Anzahl von Borstenvorläuferzellen als Grund für die Ausbildung zusätzlicher Borsten unter Einfluss des Konstruktes *dock^{myr}#51-6* in Frage kommt. Es ist zudem nicht immer zutreffend, von der Borstenanzahl der adulten Fliege auf die Anzahl der angelegten Sinnesorgane zu schließen. Die gefundenen Daten deuten jedoch darauf hin, dass die zusätzlichen Borsten nicht auf Kosten der Sockelzellen gebildet werden, sondern die Fehldetermination zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt. Eine genauere Analyse unter Einbeziehung der gebildeten Neurone und Hüllzellen wurde nicht durchgeführt.

3.2.3.2.4 Genetische Interaktionsstudien mit *wave* und *wasp*

Für den Phänotyp von *kette* im ZNS konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Gendosis von *wave* die partielle Rettung des Phänotyps zur Folge hat. Die phänotypischen Auswirkungen von membranassoziiertem KETTE, ABI und SRA-1 auf die Anzahl und Morphologie der Borsten können durch Reduktion des WASP-Levels reprimiert werden und zeigen damit eine deutliche WASP-Abhängigkeit. Beide Proteine sind also als Interaktionspartner verschiedener Komplexmitglieder bereits in Erscheinung getreten. Um die Rolle von DOCK in diesem Zusammenhang genauer zu

untersuchen, wurden die phänotypischen Auswirkungen der membranassoziierten Proteinform auf die Ausbildung der mechanosensorischen Borsten bei Reduktion der Gendosis von *wave* und *wasp* analysiert. Wie in Abb. 40 zu erkennen, zeigte weder die Reduktion des WAVE- noch die Reduktion des WASP-Levels eine maßgebliche Veränderung des DOCK^{myr}-Phänotyps.

Um dieses Ergebnis abzusichern, wurden mindestens 50 Tiere auf ihren Phänotyp überprüft. Die Tabelle kann im Anhang XIV eingesehen werden. Die Stärke des Phänotyps wurde genauso bemessen wie in den vorherigen Versuchen die Stärke der Phänotypen der einzelnen membranassoziierten DOCK-Konstrukte. Aufgrund der wenigen ausgewerteten Tiere konnten die Zahlen nur Anhaltspunkte des richtigen Sachverhaltes geben, nicht den Sachverhalt übergreifend darstellen. Nur Abweichungen von 10 % oder mehr finden daher im Folgenden Eingang.

Ein signifikanter Unterschied in der Stärke der Phänotypen, bemessen an der Anzahl der betroffenen Borsten, konnte weder bei einer Reduktion der *wasp*- noch der *wave*-Gendosis beobachtet werden.

Eine Genreduktion von *wasp* hatte zur Folge, dass ein um 10 % größerer Anteil der Fliegen fehlende Borsten am Kopf aufweist. Der Effekt auf dem Thorax ist genau umgekehrt. Es zeigen 16 % weniger Fliegen fehlende Borsten auf dem Thorax, so dass die Echtheit dieses Effektes in Frage gestellt bleibt. 10 % der Fliegen zeigten zusätzlich dünnere Borsten.

Bei Reduktion von WAVE erniedrigt sich der Anteil der Fliegen mit fehlenden Borsten auf dem Kopf um 10 %. Zudem findet man deutlich weniger Fliegen mit ektopischen Borsten auf dem Thorax, nur noch 30 % im Vergleich zu 60 % bei Expression des *dock^{myr}*-Konstruktes allein. Da die Anzahl der betroffenen Makrochaeten besonders am Kopf sehr groß erschien, wurde auch die durchschnittliche Zahl der veränderten Makrochaeten gezählt. Tatsächlich waren im Schnitt etwa 1,8 Borsten am Kopf mehr betroffen, was zum Teil auf eine leicht erhöhte Anzahl ektopischer Borsten zurückzuführen war.

Bei Reduktion beider Proteinlevel steigt der Anteil von Fliegen, die gespaltene Makrochaeten auf dem Thorax aufweisen, um 18 % auf 98 % aller gezählten Tiere.

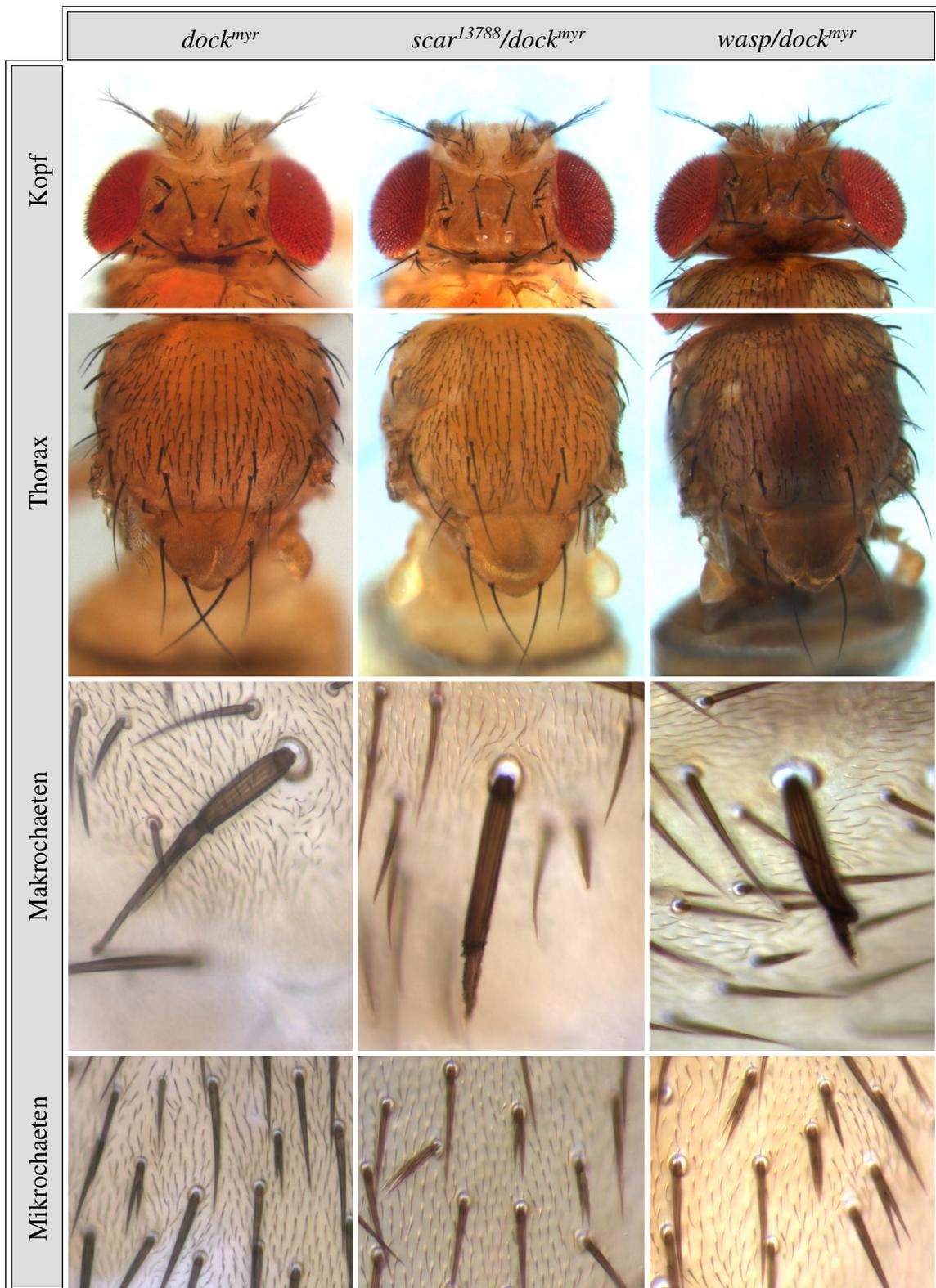


Abb. 39: Phänotypische Untersuchung der Interaktionen von DOCK mit SCAR/WAVE und WASP anhand der mechanosensorischen Borsten.

Der Vergleich zeigt keinen Effekt der Reduktion des Proteinlevels von SCAR/WAVE oder WASP auf den Phänotyp der Makro- bzw. Mikrochaeten, der durch Expression des *dock^{myr}#51-6*-Konstruktes mit *scaGal4* erzeugt wird. Die Makro- und Mikrochaeten sind Thoraxpräparationen in Hoyers Medium/Milchsäure 1:1. Alle Abbildungen sind Projektionen.

Zugleich sinkt der Anteil der Tiere, die gebogene (*wavy*) Borsten aufweisen um mehr als 75 %.

Aufgrund dieser marginalen Unterschiede konnte keine definitive Aussage über die Interaktion der Proteine bei der Entwicklung der mechanosensorischen Borsten getroffen werden. Es wurde daher ein weiterer Versuch angeschlossen.

3.2.3.2.5 Interaktionsstudien anhand des Konstruktes *wasp Δ CA*

Die geringen Auswirkungen der *wasp*-Mutante auf den durch Expression des membranassoziierten *dock*-Konstruktes erhaltenen Phänotyp stand nicht im Einklang mit veröffentlichten Daten des DOCK Homologs NCK. Es wurde gezeigt, dass die lokale Konzentration von NCK an der Membran die WASP-abhängige Aktinpolymerisation beeinflusst (Rivera *et al.*, 2004). Um diesen Zusammenhang für das *Drosophila* Homolog *dock* genauer zu untersuchen, wurde ein Verkürzungsbaustein von *wasp* mit dominant negativer Wirkung verwendet, bei dem die CA-Domäne deletiert ist, *wasp Δ CA*. Für dieses Baustein wurde eine Wechselwirkung mit den membranassoziierten Formen von KETTE und ABI beschrieben.

Die Expression des Konstruktes im *scaGal4*-Expressionsmuster führt zu einem ähnlichen aber milderem Phänotyp wie die *wasp* Mutationen, die zum Verlust von Makro- und Mikrochaeten auf dem Kopf und Thorax (Ben-Yaacov *et al.*, 2001) führen. Den Tieren gelingt es zudem häufig nicht, die Puppenhülle zu verlassen. Zudem zeigen sie ein passives Verhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konstrukte *wasp Δ CA* und *dock^{myr}* in einem Versuchsansatz durch *scaGal4* aktiviert. Die erhaltenen Fliegen unterschieden sich deutlich vom *dock^{myr}*-Phänotyp. Auffällig war der Verlust vieler Makrochaeten sowohl auf dem Kopf als auch auf dem Thorax (Abb. 41). Auch ein Großteil der Mikrochaeten auf Thorax und Abdomen (Daten nicht gezeigt) ging verloren (Abb. 41). Die verbleibenden Mikrochaeten waren häufig dupliziert oder gespalten, zu einem signifikanten Anteil auch mehrfach, was bei Expression von *dock^{myr}* nicht beobachtet werden konnte (Abb. 41). Die verbleibenden Makrochaeten zeigten zum Teil noch morphologische Veränderungen, wie sie bei Expression von *dock^{myr}* beobachtet werden

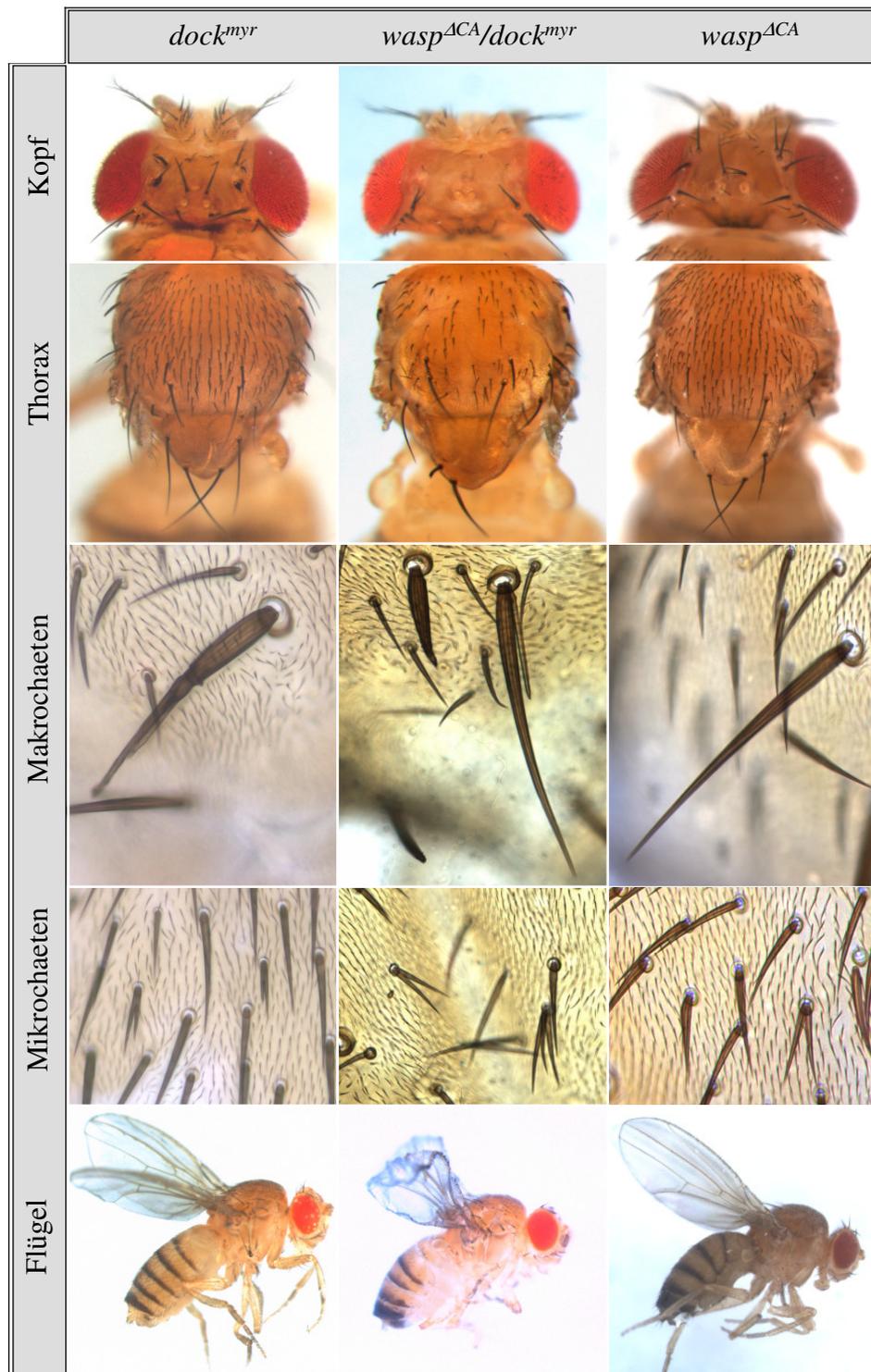


Abb. 40: Interaktion von WASP^{ACA} mit DOCK^{myr}.

Ansichten adulter Fliegen, alle Aufnahmen mit Ausnahme der Flügel sind Projektionen. Makro- und Mikrochaeten sind Präparationen in Hoyers Medium/Milchsäure 1:1. Auf dem Kopf und Thorax fehlen viele Makro- und Mikrochaeten. Verbliebene Makrochaeten zeigen zum Teil einen Phänotyp, der dem des *dock^{myr}*-Konstruktes getrieben mit *scaGal4* ähnelt. Die Mikrochaeten sind jedoch teilweise mehrfach gespalten. Der Flügelphänotyp ist verstärkt. Die Phänotypen von *dock^{myr}* und *wasp^{ACA}* sind zum Vergleich angegeben.

konnten (Abb. 41). Diese Effekte sind bei *wasp*-Mutanten nicht erkennbar (Ben-Yaacov *et al.*, 2001). Der Flügel- und Augenphänotyp erscheint gegenüber den *dock^{myr}*-Fliegen verstärkt (Abb. 41). Außerdem hatten die Fliegen Schwierigkeiten beim Verlassen der Puppenhüllen.

Es lässt sich insgesamt feststellen, dass die gleichzeitige Expression einer membranassoziierten Form von DOCK und einer dominant negativen Form von WASP eine partielle Phänokopie der WASP-Mutanten zur Folge hat, die gegenüber der alleinigen Expression der dominant negativen Form verstärkt ist. Eine Interaktion von DOCK und WASP im Hinblick auf die ARP2/3-abhängige AKTIN-Polymerisation ist daher anzunehmen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt genetische und phänotypische Analysen von Genen vor, denen in der Musterbildung des embryonalen ZNS von *Drosophila melanogaster* eine essentielle Bedeutung zukommt. Im Rahmen einer Deletionskartierung mit anschließender Komplementationsanalyse wurde das Gen *mummy* einer Transkriptionseinheit zugeordnet und mit der funktionellen Analyse des Gens begonnen. Bei Untersuchungen zum Gen *kette* stand eine phänotypische Charakterisierung der Genfunktion in adulten Geweben sowie die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern im Vordergrund. Der dritte Teil dieser Arbeit beinhaltet die phänotypische Darstellung des KETTE-Interaktionspartners *dreadlocks* anhand einer *gain-of-function*-Analyse, sowie genetische Interaktionsstudien.

4.1 *mummy* kodiert eine *Drosophila*-UDP-N-Acetylglucosamin Pyrophosphorylase

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *mummy* anhand einer Komplementationsanalyse einer Transkriptionseinheit zugeordnet werden. Das entsprechende Gen, *CG9535*, kodiert die potentielle UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE von *Drosophila* mit zwei Isoformen.

Dieses Resultat liefert eine einfache Erklärung für die zuvor erhaltenen widersprüchlichen Ergebnisse einer „male recombination“-Analyse und einer molekularen Untersuchung von Transposonexzisionsmutanten. Das für die „male recombination“ verwendete, vitale *EP(2)2016* ist innerhalb der Transkriptionseinheit des *CG9535*, 3' des Transkriptionsstartpunktes, gelegen. Für eine „male recombination“ ist es damit nicht geeignet. Zum einen führt die Rekombination im Umkreis von 4 kb in diesem Fall kaum zu Tieren, die sowohl das EP als auch das zu untersuchende Allel auf demselben Chromosom tragen, zum anderen kann es in den angrenzenden genomischen Bereichen zu Deletionen und Duplikationen kommen (Sved *et al.*, 1995; Preston und Engels, 1996), so dass auf diese Weise Mutanten des selben Gens erzeugt werden, das untersucht werden soll. In keinem Fall ist eine Aussage darüber möglich, ob das P-Element proximal oder distal des Gens liegt. Es kann dagegen zu falschen Aussagen kommen, da die Rekombination möglicherweise

nicht im Gen stattfindet, sondern außerhalb, und damit nicht auf der dem *EP*-Element zugewandten Seite des Gens, worauf das System basiert (Chen *et al.*, 1998).

Die UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE katalysiert die Umwandlung von N-Acetyl-D-glucosamin-1-phosphat in UDP-N-Acetylglucosamin unter Verwendung eines UTP. Das UDP-N-Acetylglucosamin ist ein Grundbaustein für die Chitinsynthese, für die Glycosylierung unterschiedlichster Proteine und Lipide und für die GPI-Ankersynthese (Eisenhaber *et al.*, 1999; Merzendorfer und Zimoch, 2003; Yan und Lennarz, 2005). Diese Vielfalt der Prozesse erklärt möglicherweise die Menge der unterschiedlichen Entwicklungsvorgänge, in denen *mummy* von Bedeutung zu sein scheint. Tatsächlich sind für jeden der *mummy*-abhängigen Entwicklungsprozesse wichtige Komponenten bekannt, die auf die eine oder andere Weise von der Verfügbarkeit des UDP-N-Acetylglucosamins abhängig sind.

4.1.1 Die Phänotypen von *mummy* sind auf den Verlust von UDP-N-Acetylglucosamin zurückzuführen

Die trachealen Defekte, die für *mummy* beobachtet wurden, scheinen nach neuesten Erkenntnissen auf die gestörte Chitin-Synthese zurückzuführen zu sein (Araujo *et al.*; Tønning *et al.*; Devine *et al.*, alle eingereicht). Auch die kutikulären Defekte lassen sich so erklären, haben jedoch noch weitere Ursachen, die auf den Mangel an UDP-N-Acetylglucosamin zurückgehen. So ist beispielsweise das glycosylierte und GPI-verankerte Protein KNK für die Differenzierung der Kutikula essentiell (Tønning, *et al.*; eingereicht).

Für den ZNS-Defekt ist die gestörte Chitinsynthese nicht verantwortlich, da Mutationen in der Chitin-Synthase 1 keinen ZNS-Phänotyp aufweisen (Daten nicht gezeigt). Die Entwicklung des ZNS ist jedoch von Glycoproteinen, Glycolipiden, Proteoglycanen und GPI-verankerten Proteinen abhängig. So ist UDP-N-Acetylglucosamin beispielsweise eine essentielle Komponente der Heparansulfat-Proteoglycane (HSPGs), die für viele Signalkaskaden essentiell sind (Kramer und Yost, 2003; Yamaguchi, 2001). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von SLIT, einer Schlüsselkomponente der axonalen Wegfindung im ZNS von *Drosophila*, von den HSPGs *syndecan* und *dally-like* moduliert wird (Steigemann *et al.*, 2004; Johnson *et*

al., 2004). Dabei sprechen einige Daten für eine essentielle Rolle der Heparansulfatketten bei der Lokalisation von SLIT (Johnson *et al.*, 2004; Holt und Dickson, 2005). Zudem wird die Genauigkeit der Axon Faszikulation von der Glycan Expression beeinflusst (Song und Zipser, 1995; Stoeckli und Landmesser, 1998). Auch diese Interaktion zeigt, dass die Entwicklung des ZNS in mehrfacher Hinsicht von der Verfügbarkeit der Schlüsselkomponente UDP-N-Acetylglucosamin abhängig ist. Die Ursache des Phänotyps von *mummy* im ZNS ist daher höchstwahrscheinlich eine Kombination verschiedener Störungen, ihrerseits ausgelöst durch den Mangel an UDP-N-Acetylglucosamin.

Die beschriebenen Effekte erscheinen für ein Schlüsselenzym so vieler Prozesse vergleichsweise mild. Es konnte jedoch eine starke maternale Komponente nachgewiesen werden, die Effekte maskiert (Tonning *et al.*, eingereicht). Für die Interpretation weiterer Untersuchungen sollte dieser Effekt berücksichtigt werden.

Zudem sind zwar in *Drosophila* bisher die Wege zur Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin noch unzureichend erforscht, es ist jedoch wahrscheinlich, dass es weitere Enzyme gibt, die diese Funktion übernehmen können, da das Expressionsmuster von *mummy* nicht mit dem entwicklungsbiologisch übergreifenden Bedarf an UDP-N-Acetylglucosamin in Einklang steht. Ein Enzym, das einen alternativen Weg zum UDP-N-Acetylglucosamin katalysieren könnte, ist die UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-4-EPIMERASE, die UDP-N-Acetylglucosamin zu UDP-N-Acetylgalactosamin und vice versa umwandeln kann (Mok *et al.*, 2005). Für *Drosophila melanogaster* ist jedoch keine UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-4-EPIMERASE vorhergesagt (<http://flybase.bio.indiana.edu>; <http://www.ebi.ac.uk>).

4.1.2 Die Funktion von *mummy* bei der Glycosylierung von Proteinen

Eine *Western-Blot*-Analyse mit Embryonenlysaten aus *mummy*-mutanten und wildtypischen Embryonen zeigte für FASIII, ein *septate-junction*-Glycoprotein, eine zusätzliche Proteinbande, die in den Wildtyp-Spuren nicht beobachtet werden konnte. Es scheint also einen Zusammenhang der *mummy*-Genfunktion mit der Größe dieses glycosylierten Proteins zu geben, was einen deutlichen Hinweis für die Bedeutung *mummys* bei der Glycosylierung darstellt. Für FASIII konnte in *mummy*-Mutanten eine

abnorme Lokalisation gefunden werden (Tonning *et al.*, eingereicht), was möglicherweise auf Glycosylierungsdefekte zurückzuführen ist, da posttranslationale Modifikationen die subzelluläre Lokalisation beeinflussen (Tootle und Rebay, 2005). Eine Färbung des Nervensystems mit α -HRP-Antikörper, der mindestens 17 verschiedene Proteine aufgrund ihrer Glycosylierung erkennt (Snow *et al.*, 1987), ist dagegen in *mummy*-mutanten Embryonen nicht reduziert (Daten nicht gezeigt). Da nicht alle Glycosylierungsprozesse UDP-N-Acetylglucosamin benötigen, steht diese Beobachtung jedoch nicht im Widerspruch zu einer Bedeutung von *mummy* bei der Glycosylierung.

Der Prozess des dorsalen Schlusses ist von der Funktion des Proteins DECAPENTAPLEGIC (DPP) abhängig, für das eine Glycosylierung vermutet wird (Groppe *et al.*, 1998). Auswirkungen posttranslationaler Modifikationen auf die Stabilität, Verteilung oder Funktion von Proteinen sind bereits in anderem Zusammenhang berichtet worden (Tootle und Rebay, 2005) und könnten die Ursache der Defekte von *mummy*-Mutanten beim dorsalen Schluss der Epidermis darstellen. Zudem wurde beschrieben, dass die Glycosylierung Einfluss auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren nehmen kann (Comer und Hart, 1999; Zachara und Hart, 2002; Tootle und Rebay, 2005). Auf diese Weise ließe sich die Tatsache erklären, dass in *mummy*-mutanten Embryonen die Expression von *dpp* herunterreguliert erscheint. Zusätzlich gibt es jedoch auch eine andere Verbindung von *mummy* zum dorsalen Schluss der Epidermis. Eine genetische Interaktionsstudie belegte eine Interaktion mit PANNIER (PNR), einem Transkriptionsfaktor und Aktivator von *dpp*, der für den dorsalen Schluss der Epidermis von entscheidender Bedeutung ist (Pena-Rangel *et al.*, 2002), aber parallel zum *JNK*-Signalweg wirkt (Herranz und Morata, 2001). Die Interaktion wurde durch Überexpression mit Hilfe des *EP(2)2016* durch *pnrGal4* nachgewiesen, die zur Letalität der Tiere führte. Die molekulare Grundlage ist bisher nicht weiter erforscht. Es ist jedoch ein Szenario denkbar, in dem eine erhöhte UDP-N-Acetylglucosamin-Konzentration die Ursache der Letalität ist, da Prozesse wie subzelluläre Verteilung, Stabilität und Interaktionen von einer regulierten Glycosylierung der beteiligten Proteine abhängen (Tootle und Rebay, 2005). Zudem wurde gezeigt, dass *pannier* in früheren Entwicklungsprozessen von *dpp* aktiviert wird

(Herranz und Morata, 2001). Eine genaue Aufklärung, welcher Art die Einflussnahme von *mummy* auf den Prozess des dorsalen Schlusses ist, steht daher noch aus.

4.1.3 Der Einfluss von *mummy* auf die GPI-Ankersynthese

Als Grundbaustein für die GPI-Ankersynthese ist die Verfügbarkeit von UDP-N-Acetylglucosamin ebenfalls für viele posttranslational modifizierte Proteine essentiell. Die in *mummy*-Mutanten modifizierten Entwicklungsprozesse könnten auch über diese Funktion des UDP-N-Acetylglucosamins mit der Genfunktion korreliert werden. Die Biosynthese der GPI-Anker im ER ist in zwei Hauptschritte zu gliedern. Zum einen den Zusammenschluss der GPI-Einheit (Kinoshita und Inoue, 2000) und zum anderen die Übertragung der Anker-Einheit auf das Protein (Abb. 41).

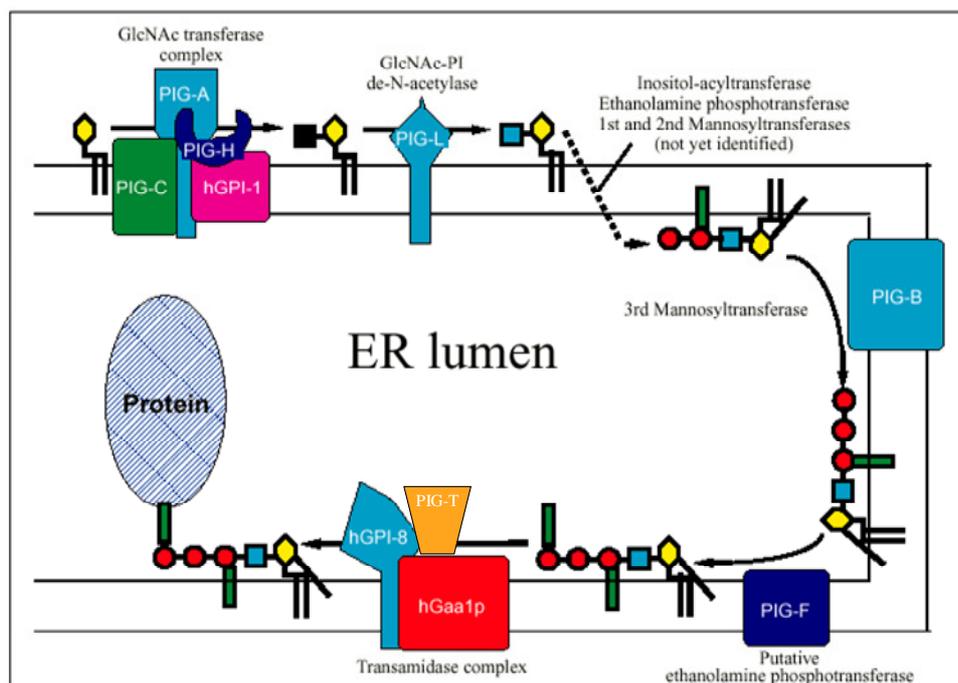


Abb. 41: Modell der GPI-Anker-Biosynthese. Eine vorgefertigte GPI-Ankereinheit wird durch den TRANSAMIDASE-Komplex, dessen einer Bestandteil das Protein PIG-T ist, auf das Protein übertragen. (Abb. modifiziert nach Ferguson, 1999)

Dieser Prozess ist abhängig von der Funktion des TRANSAMIDASE-Proteinkomplexes, der aus mindestens 5 Proteinen, GPI8, GAA1, PIG-S, PIG-T und PIG-U, besteht (Ikezawa, 2002; Hong *et al.*, 2003) (Abb. 41). Wenn die Defekte in *mummy*-Mutanten auf die gestörte GPI-Ankerproduktion zurückzuführen sind, sollten auch andere für die Erstellung des GPI-Ankers unverzichtbare Gene die genannten Entwicklungsprozesse

beeinflussen. Eine phänotypische Analyse des ZNS von mutanten Embryonen des Allels *CG11190^{PG111}*, dem putativen PIG-T-*Drosophila*-Homolog, ergab jedoch keinen Hinweis auf die Abhängigkeit der korrekten Musterbildung im ZNS von der GPI-Ankersynthese. Und weder die *Western-Blot*-Analyse des Proteins FASII, von dem eine GPI-geankerte Isoform existiert, noch die subzelluläre Verteilung eines GFP-GPI-Proteins im *mummy*-mutanten Hintergrund lieferten einen Hinweis auf die Beteiligung von *mummy* an diesem Syntheseweg. Diese Daten könnten ein Hinweis darauf sein, dass die GPI-Ankersynthese vom zygotischen Verlust der *mummy*-Genfunktion nicht betroffen ist. Eine *Western-Blot*-Analyse des GFP-GPI ergab jedoch eine Veränderung in der Größe des detektierten GFP-Proteins in Embryolysaten, die zu 25 % aus *mummy*-Mutanten gewonnen wurden. Es konnte eine zusätzliche GFP-positive Bande im Bereich um 29 kDa detektiert werden, die in den *daGal4/UAS* GFP-GPI-Embryonen-Kontrolllysaten nicht erkennbar war. Die Proteingröße entspricht in etwa der erwarteten Größe des GFP-Proteins ohne den GPI-Anker. Proteine, die aufgrund einer Störung nicht mit einem GPI-Anker versehen werden können, verbleiben im ER und werden degradiert (Trombetta und Parodi; 2005). Da durch die hier genutzte Art der Lysatgewinnung das ER ebenfalls mit isoliert wird, wäre es möglich, das „stecken gebliebene“ GFP-Protein im *Western-Blot* zu detektieren. Aufgrund dieser Beobachtung kann eine Funktion von *mummy* in der GPI-Ankersynthese weiterhin in Betracht gezogen werden. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu der Beobachtung, dass die subzelluläre Verteilung des gleichen Proteins nicht verändert erscheint. Die starke maternale Komponente von *mummy* könnte jedoch Effekte maskieren (Tonning *et al.*, eingereicht). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, Keimbahnklone von *mummy* zu machen und im Folgenden die Verteilung des GFP-GPI zu untersuchen. Es konnte also nicht abschließend geklärt werden, ob *mummy* wirklich eine Funktion während der GPI-Ankersynthese ausübt, so dass sich eine weitere Analyse dieses Zusammenhangs anschließen sollte.

4.2 Identifizierung von KETTE-Interaktionspartnern *in vivo*

Die bereits beschriebene Funktion von KETTE in der AKTIN-Zytoskelett-Organisation ist als Ursache aller Defekte in *kette*-Mutanten denkbar, möglicherweise sind jedoch nicht alle Interaktionspartner in diesem Zusammenhang bekannt.

Im Rahmen eines großen *Hefe-2-Hybrid*-Experimentes von Dr. Sven Bogdan wurden potentielle Interaktionspartner von KETTE identifiziert, die in meiner Arbeit auf ihre Relevanz *in vivo* getestet werden sollten. Weitere Interaktionspartner sollten durch genetische Methoden aufgedeckt werden. Dazu wurden die folgenden zwei Systeme verwendet, deren Basis die Veränderung eines KETTE-verursachten Phänotyps durch interagierende Proteine ist. (1) Eine hypomorphe Allelkombination von *kette* hat einen Phänotyp an Borsten, Augen und Flügeln zur Folge. (2) Die Überexpression einer membranassoziierten Form des KETTE-Proteins verursacht, getrieben mit dem Treiber *GMRGal4*, einen Augenphänotyp.

Von den im *Y2H*-Assay gefundenen Genen konnten insgesamt sechs mit einer Veränderung des Phänotyps korreliert werden, wobei nur ein Interaktionspartner anhand der Veränderung des hypomorphen *kette*-Phänotyps aufgedeckt wurde. Es ist jedoch zu bedenken, dass die beschriebenen Gene zwar im Bereich der jeweiligen Defizienzen liegen, jedoch nicht zwingend auch für den Effekt der phänotypischen Veränderung verantwortlich sein müssen. Es muss daher überprüft werden, ob die entsprechenden Gene tatsächlich genetisch interagieren. Dazu können in manchen Fällen kleinere Defizienzen herangezogen werden, die zum Teil molekular charakterisiert sind (Ryder *et al.*, 2004).

Eine Ausnahme bildet das Gen *sc2*, das aufgrund der phänotypischen Veränderung der *kette*-Escaper durch eine P-Element-Insertion gefunden wurde. Auch eine Defizienz, die diesen Bereich deletiert, bewirkte eine Veränderung. Es kann daher für dieses Gen eine Interaktion angenommen werden, wobei nicht bestimmt wurde, welcher Art die genetische Interaktion ist. Alle Deletionen, die den entsprechenden Bereich deletieren waren jedoch im Defizienzenkitscreen für die Veränderung des Überexpressionsphänotyps nicht von Bedeutung.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Untersuchung der *Escaper* das sensitivere System darstellt und der ohnehin nicht sehr exzessive Effekt daher bei der Untersuchung der

Veränderungen auf den Überexpressionsphänotyp nicht beobachtet werden konnte. Dagegen spricht jedoch, dass beispielsweise der im Defizienzenkitscreen beobachtete Verstärkungs-Effekt der Defizienz *Df(3L)st-f13* keine Veränderung in der *Escaper*-Analyse bewirkte. Eine generelle größere Sensitivität ist daher unwahrscheinlich. Im Allgemeinen scheint jedoch der verstärkende Effekt eines Interaktionspartners auf den Phänotyp deutlicher und einfacher erkennbar zu sein, so dass möglicherweise „abschwächende“ Interaktionspartner nur bedingt gefunden werden können. Die Überexpressions-Analysen wurde zusätzlich von der phänotypischen Diversität des verwendeten Stammes beeinflusst, was nur zum Teil durch die Betrachtung vieler Tiere und ihrer Gesamtheit ausgeglichen werden konnte. Diese Faktoren könnten eine Erklärung dafür liefern, dass von den bereits bekannten Interaktionspartnern nur SRA-1 gefunden wurde.

Die Deletion *Df(3R)ea*, die den Interaktionspartner SRA-1 beinhaltet (Bogdan und Klämbt, 2003), bewirkt eine Abschwächung des Überexpressionsphänotyps. Der beobachtete Effekt war jedoch relativ mild, was vermutlich auf die Reduktion der *Sra-1*-Gendosis um nur eine Kopie zurückzuführen war.

Es bleibt jedoch für alle Defizienzen, inklusive der *Df(3R)ea*, herauszufinden, welche Transkriptionseinheit für die jeweilig beobachteten Effekte auf den Phänotyp des überexprimierten membranassoziierten KETTE-Proteins verantwortlich ist. Es ist wahrscheinlich, aber nicht zwingend, dass die bereits im *Hefe-2-Hybrid*-Experiment gefundenen Kandidaten den Effekt hervorrufen. Eine genauere Aufschlüsselung durch den Einsatz kleinerer Defizienzen oder *P*-Element-Insertionen konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht erfolgen.

4.3 Der Zelltod des *kette*-mutanten Gewebes bei der klonalen Analyse ist nicht auf die Funktion von *kette* zurückzuführen

Um Aussagen über die Funktion des Gens *kette* in adulten Geweben treffen zu können, sollte die FLP/FRT-Technik verwendet werden (Xu und Rubin, 1993). Zur Erstellung des entsprechenden *kette*-FRT-Chromosoms wurde erneut die Methode der „male recombination“ angewandt. Dabei war die Tatsache ausschlaggebend, dass in den allermeisten Fällen das *P*-Element an der gleichen Position im Genom verbleibt

(Preston und Engels, 1996). Da jedoch für die Herstellung des FRT-Chromosoms ein EMS-induziertes Allel verwendet worden war, wurde das Chromosom durch Rekombination „gereinigt“. Das gereinigte und das ungereinigte *kette*FRT-Chromosom wurde gegen verschiedene Stämme getestet, die eine FLIPASE-Quelle trugen.

In keinem Fall war das homozygot *kette*-mutante klonale Gewebe zu erkennen, obwohl die homozygot wildtypischen Bereiche aufgrund der Markierungen einwandfrei angesprochen werden konnten. Eine Funktionsunfähigkeit der FRT-Sequenz aufgrund der „male recombination“ konnte daher ausgeschlossen werden. Die einfachste Erklärung, dass *kette* in Homozygose zum Zelltod der klonalen Zellen führen sollte, erschien jedoch auf den ersten Blick nicht hinreichend evident, da dieser Effekt bisher nicht bestimmend für den beschriebenen Verlustphänotyp von *kette* war (Hummel, 1998). Es ist jedoch möglich, dass die maternale Komponente von *kette* die entsprechenden Effekte maskiert (Hummel, 1998).

Es kamen jedoch noch zwei weitere Möglichkeiten als Verursacher des Zelltods in Betracht. Da sich nach der Reinigung das Allel *thread^l* (*th^l*) nachweislich auf dem Chromosom befand, kann der Austausch bis zu der Region von *th* bei 72D1 als gegeben betrachtet werden. Da der andere Arm des Chromosoms durch das Ereignis der „male recombination“ ausgetauscht sein sollte, war die Möglichkeit eines zusätzlichen „letalen hits“ auf dem *kette*-Chromosom zwar eingeschränkt, aber nicht auszuschließen. Zum anderen wurde für die Methode der „male recombination“ bereits beschrieben, dass es zu Duplikationen und Deletionen in der näheren Umgebung des *P*-Elementes kommen kann (Sved *et al.*, 1995; Preston und Engels, 1996). Beide Möglichkeiten beinhalten, dass der Ausfall von *kette* eventuell nicht als ursächlich für den beobachteten Zellverlust angenommen werden kann.

Zur Aufklärung des Sachverhaltes wurde ein Rettungsexperiment durch Expression eines UAS-*kette*-Konstruktes durchgeführt. Es war jedoch kein Unterschied zu den Imaginalscheiben ohne Aktivator und UAS*kette*-Konstrukt erkennbar. Dieses Ergebnis spricht für einen Auslöser des Zelltodes unabhängig von *kette*.

4.4 KETTE, SRA-1 und DOCK sind für AKTIN-abhängige Prozesse von Bedeutung

Entwicklungsbiologische Prozesse wie Migration und Zellformveränderung setzen die Fähigkeit einzelner Zellen voraus, auf Signale ihrer Umwelt durch Regulation ihres AKTIN-Zytoskeletts zu reagieren. Ein bedeutender Regulator der AKTIN-Polymerisation ist der Arp2/3-Komplex, der sowohl *de novo*-Polymerisation als auch Filamentbildung an bestehenden Aktinfasern durch Verzweigung katalysiert und seinerseits von den Proteinen der WASP/WAVE-Familie reguliert wird (Takenawa und Miki, 2001; Stradal *et al.*, 2004; Millard *et al.*, 2004).

An der Regulation dieser Proteine ist ein Proteinkomplex, beinhaltend KETTE, ABI und SRA-1, beteiligt, dessen Mitglieder sich gegenseitig stabilisieren (Eden *et al.*, 2002; Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005). ABI kann strukturell wie funktionell als Schlüsselprotein dieses Komplexes angesehen werden, da es sowohl WAVE und WASP als auch KETTE binden kann (Bogdan *et al.*, 2005). Während die Daten betreffend der Regulation von WAVE unklar sind (Eden *et al.*, 2002; Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004), ist die Aktivierung von WASP belegt (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005; Innocenti *et al.*, 2005).

Für alle Proteine des Komplexes wurde gezeigt, dass sie ihre Funktion an der Membran ausüben und daher die Membranrekrutierung einen essentiellen Anteil an ihrer Funktion hat (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005). Der Mechanismus der Membranrekrutierung und die dafür relevanten Proteine konnten jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Das SH2/SH3-Adapter Protein DREADLOCKS (DOCK) könnte in dieser Hinsicht von besonderer Bedeutung sein, da biochemische Untersuchungen die Interaktion von SRA-1 mit dem Säugerhomolog von DOCK, NCK (Kitamura *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1998) und die Bindung von ABI und WASP an DOCK gezeigt haben (Bogdan, unveröffentlicht). Zudem wurde belegt, dass NCK/DOCK andere Proteine an die Membran rekrutieren kann (Galisteo *et al.*, 1996; Hing *et al.*, 1999; Rao, 2005) und die Rekrutierung von NCK an der Membran zu einer WASP-abhängigen AKTIN-Polymerisation führt (Rivera *et al.*, 2004).

Mutationen in *dock* und *kette* führen zu Projektionsdefekten der Axone der Retina von *Drosophila*. Eine genetische Interaktion konnte für die beiden Proteine anhand einer Doppelmutanten-Analyse gezeigt werden (Hummel *et al.*, 2000). Zudem zeigen homozygote *dock*-Embryonen eine Reduktion der longitudinalen Konnektive ähnlich dem Phänotyp der hypomorphen *kette*-Embryonen. Die Trennung der Kommissuren ist ebenfalls defekt und auch Projektionsdefekte der VUM-Neurone sind beschrieben worden (Hummel *et al.*, 2000). Diese Daten sprechen für eine Interaktion von *kette* und *dock* zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung.

Die danach wahrscheinliche Rolle von DOCK bei der Membranrekrutierung des Komplexes sollte in dieser Arbeit anhand von Überexpressionsstudien untersucht werden. Eine Untersuchung der Funktion von DOCK in adulten Geweben, insbesondere der Entwicklung der mechanosensorischen Borsten, sollte jedoch anhand von *loss-of-function*-Untersuchungen noch erfolgen.

Da die Entwicklung der mechanosensorischen Borste es ermöglicht, anhand der Morphologie und der Anzahl der Borstenzellen Rückschlüsse auf die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts zu ziehen, wurde sie als Modellsystem zur Untersuchung AKTIN-abhängiger Prozesse eingesetzt. Dieses Modell ist bereits für Analysen einiger Komplexmitglieder des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes und ihres Einflusses auf die AKTIN-Regulation verwendet worden (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005), so dass vergleichbare Daten existieren. Im Nachfolgenden soll die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit, sofern sie die Regulation AKTIN-abhängiger Prozesse durch die Proteine KETTE und DOCK betreffen, bezüglich der zwei Aussagemöglichkeiten des Modells dargestellt werden.

4.4.1 KETTE und DOCK verändern die AKTIN-abhängige Morphologie der mechanosensorischen Borsten

4.4.1.1 Die Entwicklung der mechanosensorischen Borste

Die Borstenzelle bringt einen Fortsatz hervor, der longitudinale F-AKTIN-Bündel enthält, die sich innerhalb eines Zeitraums zwischen 32 und 48 h *APF* verlängern. Das Wachstum geschieht an der Spitze der entwickelnden Borste (Lees und Picken, 1944) sowie entlang des Schaftes (Tilney *et al.*, 1996, 2000; Fei *et al.*, 2002; Tilney *et al.*,

2003) und beruht auf AKTIN-Polymerisation (Tilney *et al.*, 2000a), wobei ein ständiger Umsatz, d. h. Filamentauf- und -abbau stattfindet (Tilney *et al.*, 2003). Die AKTIN-Bündel werden durch Proteine wie FASCIN und FORKED quervernetzt zu modularen Bündeln, die eine Länge von 1-5 μm aufweisen (Tilney *et al.*, 2000b). Diese Module wachsen an den Enden zusammen und produzieren so feste Bündel (Guild *et al.*, 2003), die längs des Borstenschaftes mit der Plasmamembran verbunden sind (Tilney *et al.*, 1996). Die Stabilität der AKTIN-Bündel wird durch Quervernetzung und Kontakt zur Plasmamembran gefördert, was zu einer allmählichen Selektion größerer und damit stärker vernetzter Bündel entlang der Membran führt (Tilney *et al.*, 2003). Der Raum zwischen den einzelnen Bündeln wird dabei vermutlich derart gebildet, dass die dazwischen liegenden kleineren Bündel mit den bereits größeren Bündeln aggregieren (Tilney *et al.*, 2003). Diese Längsbündel sind in der adulten Borste noch immer als gleichmäßig verteilte Rillen zu erkennen. Die übrigen Bündel im Zwischenraum zeigen weniger Stabilität und werden vermutlich abgebaut (Tilney *et al.*, 2003). Zu der charakteristisch gebogenen Form der Borste tragen dabei nicht nur das AKTIN-Zytoskelett und die genannten quervernetzenden Proteine, sondern auch die Sockelzelle und die innere Puppenhülle bei (Tilney *et al.*, 2004). Wenn der Prozess der Verlängerung abgeschlossen ist, wird Chitin eingelagert und die AKTIN-Bündel werden abgebaut. So entsteht ein Hohlzylinder, aus dem die adulte mechanosensorische Borste besteht. Die Regulation des AKTIN-Zytoskeletts ist also für die Entstehung der Borste von essentieller Bedeutung und Störungen resultieren in morphologischen Veränderungen.

Zwei Arten von Versuchen wurden in dieser Arbeit für die phänotypische Analyse an mechanosensorischen Borsten durchgeführt. Eine *loss-of-function*-Analyse durch Expression eines *ketterNAi*-Konstruktes sowie eine *gain-of-function*-Analyse durch Expression membranassoziierter Proteinformen von DOCK.

4.4.1.2 Die Expression von *kette*RNAi führt zu dünneren Borsten und reduzierter AKTIN-Polymerisation

Durch die Expression des *kette*RNAi-Konstruktes konnte eine vergrößerte Anzahl fehlender Borsten auf dem Thorax festgestellt werden, die durch Erhöhung der Kopienzahl des RNAi-Konstruktes leicht verstärkt werden konnte. Verringert wurde damit allerdings die Anzahl dünner, kürzerer Borsten. Es wäre möglich, dass diese Effekte unmittelbar zusammenhängen und die kürzeren, dünneren Borsten gewissermaßen eine „Vorstufe“ der fehlenden Borsten darstellen. Dafür spräche die Beobachtung, dass die Borsten mit zunehmender Verkürzung auch dünner werden. Möglich ist aber auch eine unabhängige Ursache, da die fehlenden Borsten meist mit dem Verlust der Sockelzelle einhergingen, wohingegen die dünneren und kürzeren Borsten Sockelzellen aufwiesen. Obwohl die fehlenden und dünneren Borsten das auffälligste Merkmal der *kette*RNAi-Fliegen sind, treten auch noch andere morphologische Veränderungen an den noch vorhandenen Borsten auf. So sind manchmal gespaltene oder leicht gewellte Borsten zu beobachten. Die phänotypischen Veränderungen durch Expression des *kette*RNAi-Konstruktes korrelieren nur zum Teil mit denen, die für hypomorphe Allelkombinationen beobachtet wurden (Hummel, 1998). Ein Verlust von Borsten wurde nicht beschrieben, die Makrochaeten zeigen jedoch eine gewellte Morphologie oder sind geknickt. Ein ähnlicher Phänotyp wird bei Verlust des KETTE-Interaktionspartners SRA-1 durch RNAi beobachtet, wobei die Expression hoher *sra-1*-RNAi-Level auch zu fehlenden Borsten führt. Möglicherweise könnte also *kette*RNAi einen stärkeren Verlust von *kette* darstellen als die hypomorphe Allelkombination, was zum Verlust der Borsten führt.

Phänotypische Veränderungen der Borstenmorphologie sind auch bei Expression von *abi*RNAi zu beobachten (Stephan, 2004; Bogdan *et al.*, 2005), was für *kette* und *abi* eine Rolle in diesem Prozess wahrscheinlich macht. Es wurden neben fehlenden Borsten auch dünnere, kürzere und geknickte Makrochaeten beschrieben (Bogdan *et al.*, 2004).

Die beschriebenen Mechanismen zum Aufbau einer Borste lassen als einfachste Erklärung dünnerer und kürzerer Borsten eine Reduktion der AKTIN-Polymerisation vermuten. Die belegte aktivierende Wirkung von ABI und KETTE auf die WASP-

abhängige AKTIN-Polymerisation ließe sich damit in Einklang bringen (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2005; Innocenti *et al.*, 2005). Nach diesen Daten wäre also zu vermuten, dass die AKTIN-Polymerisation in den entwickelnden Borsten WASP-abhängig erfolgt und WASP demnach, neben der Relevanz bei Zellschicksalsentscheidungen (Ben-Yaacov *et al.*, 2001; Tal *et al.*, 2002) eine weitere Rolle bei der strukturellen Entwicklung der mechanosensorischen Organe im PNS zukommt. Für die Aktivierung der AKTIN-Polymerisation würde jedoch auch der zweite Aktivator des ARP2/3-Komplexes, WAVE, in diesem Zusammenhang in Betracht kommen, allerdings ist bisher nicht vollständig geklärt, ob die Anwesenheit der Komplexmitglieder eine aktivierende oder antagonisierende Funktion auf WAVE ausübt (Eden *et al.*, 2002; Bogdan und Klämbt, 2003; Blagg *et al.*, 2003; Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004). Diesen Überlegungen stehen die Beobachtungen entgegen, dass sowohl der ARP2/3-Komplex als auch der Aktivator WAVE bisher nur mit einem geringfügigen Effekt auf die Borstenform beschrieben wurden (Hudson und Cooley; 2002; Zallen *et al.*, 2002; Jacinto und Baum, 2003), so dass es bisher keine Anhaltspunkte für eine Funktion von WAVE bei der Borstenentwicklung gibt. Eine redundante Funktion der beiden Aktivierungswege in diesem Zusammenhang wäre dennoch denkbar.

4.4.1.3 Die Überexpression von membranassoziertem DOCK hat eine verstärkte AKTIN-Polymerisation zur Folge

Die Funktion von DOCK als potentiell membranrekrutierender Faktor sollte anhand eines membranassozierten DOCK-Proteins untersucht werden. Überexpression dieses Konstruktes sollte zu verstärkter AKTIN-Polymerisation führen, wie es bereits für die einzelnen Komplexmitglieder anhand von Überexpressionsstudien membranassoziierter Proteine gezeigt wurde (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005), falls DOCK für die Rekrutierung der Komplexkomponenten an die Membran sorgt. Tatsächlich ist genau dies der Fall.

Eine Expression der Konstrukte in *Drosophila* S2R+-Zellen zeigte eine erhöhte AKTIN-Menge in den gleichen Bereichen der Zellen, die auch durch Aggregation von DOCK-Protein gekennzeichnet waren. Generell traten verschiedene Typen von transfizierten

Zellen auf (Typ 1-3). Zum einen Zellen, die in ihrem Erscheinungsbild eine komplette Umorganisation und Zeichen eingeschränkter Vitalität zeigten, wie die Typ-1-Zellen, und zum anderen Zellen, die dem Phänotyp von Zellen glichen, die mit membranassoziiertem WASP transfiziert waren (Typ 3-Zellen) oder phänotypisch dazwischen lagen (Typ 2-Zellen). Sowohl WASP als auch DOCK können also die Bildung von Filopodien induzieren. Diese Übereinstimmungen lassen eine Funktion von DOCK im gleichen Prozess vermuten, der auch von WASP beeinflusst wird. Eine genauere Untersuchung der phänotypischen Abhängigkeit dieser Proteine untereinander anhand von Co-Expressionsexperimenten oder Untersuchungen zur Dynamik der beobachteten Zellfortsätze wurde jedoch in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Stattdessen wurde die funktionelle Analyse auf die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten konzentriert. Auch diese Phänotypen stützten die Hypothese, DOCK könnte für die Membranrekrutierung des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes von Bedeutung sein. Die Borsten, die bei Überexpression der DOCK^{myr}-Konstrukte durch *scaGal4* entstehen, sind zwar genau wie die durch *ketteRNAi* erhaltenen Borsten kürzer als wildtypische Makrochaeten, jedoch dicker und in ihrer gesamten Morphologie gestört. Es gibt keine Spitze der Borste mehr, stattdessen wirken die Borsten wie „abgebrochen“, und es zeigen sich „Knoten“ und Querverbindungen zwischen den normalerweise parallel in Längsrichtung verlaufenden Rillen, die dadurch verkürzt sind. Da diese Rillen die AKTIN-Bündel während der Entwicklung widerspiegeln, kann direkt auf die AKTIN-Polymerisation geschlossen werden (Tilney *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp ähnelt in manchen Aspekten denen, die für Verlustmutanten der quervernetzenden Proteine SINGED (FASCIN) und FORKED beschrieben wurden (Wulfskuhle *et al.*, 1998; Tilney *et al.*, 1998; Tilney *et al.*, 2003). Der Verlust der Quervernetzung führt in dem Fall zum Verlust der Verbindung der kleineren Bündel zu festen Bündeln und die Zunahme im Durchmesser der Borste könnte durch Verlängerung der nicht „übereinander“ gelegenen Module erklärt werden (Tilney *et al.*, 2003). Im Fall von DOCK ist jedoch, berücksichtigt man die vorherigen Ergebnisse, vermutlich eine verstärkte AKTIN-Polymerisation Auslöser eines ähnlichen Phänotyps. Ein fortwährender AKTIN-Filamentauf- und -abbau wurde für die entwickelnden Borsten beschrieben, der für die Form, Größe und die Lokalisierung der

AKTIN-Bündel von Bedeutung ist (Tilney *et al.*, 2003). Eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der AKTIN-Polymerisation könnte demnach als Ursache der Effekte der membranassoziierten DOCK-Proteine vermutet werden. Die Verkürzung der Borsten könnte dann auf ein gestörtes Mengenverhältnis der quervernetzenden Proteine im Vergleich zu den AKTIN-Filamenten zurückzuführen sein, so dass die Verbindung der Enden der einzelnen Module nicht mehr gewährleistet werden kann. Zudem werden AKTIN-Bündel durch den Kontakt zur Membran stabilisiert (Tilney *et al.*, 2003), was ebenfalls zu dem beobachteten Phänotyp beitragen könnte, da die erhöhte AKTIN-Polymerisation durch membranassoziiertes DOCK-Protein hervorgerufen wird.

4.4.1.4 Die Entwicklung der Mikrochaeten wird von der *dock^{myr}*-Überexpression beeinflusst

Für die membranassoziierten Formen von KETTE und SRA-1 wurden ähnliche Effekte auf die Morphologie der Borsten beschrieben wie für die membranassoziierte Form von DOCK. Vor allem bei der Betrachtung der Mikrochaeten wird dieser Effekt deutlich. Alle Konstrukte führen bei Überexpression zu gespaltenen Mikrochaeten (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004). Die Überexpression von membranassoziiertem ABI hingegen scheint die Mikrochaeten-Morphologie nicht zu beeinflussen (Stephan, 2004). Auch die Expression von *abiRNAi* hat keinen Einfluss auf die Mikrochaetenentwicklung. Es ist daher möglich, dass ABI in diesem Zusammenhang nicht oder nur eingeschränkt von Bedeutung ist. Allerdings zeigen auch die RNAi-Experimente mit KETTE und SRA-1 keine Effekte auf die Mikrochaetenentwicklung, so dass die Aussage darüber zu prüfen bleibt. Ein solcher Rückschluss steht auch im Gegensatz zu Untersuchungen, die ABI eine zentrale Rolle bei der WASP- und WAVE-abhängigen AKTIN-Polymerisation zuweisen (Bogdan *et al.*, 2005; Innocenti *et al.*, 2005) und zudem die Rolle des Verbindungsproteins zwischen dem KETTE/ABI/SRA-1-Komplex und WAVE oder WASP (Bogdan *et al.*, 2005). Eine Reduktion der Gendosis von *wasp* ist in der Lage, den beschriebenen Mikrochaeten-Phänotyp im Fall von SRA-1^{myr} und KETTE^{myr} zu retten (Bogdan *et al.*, 2004). Dieser Effekt konnte für den DOCK^{myr}-Phänotyp nicht beschrieben werden. Diese Ergebnisse machen eine weitere

Funktion von DOCK während der Mikrochaetenentwicklung denkbar, die möglicherweise WASP-unabhängig ist. Für die Rekrutierung des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes an die Membran könnte in diesem Zusammenhang ein anderes Adapter-Protein von Bedeutung sein.

4.4.1.5 Die SH3-Domänen von DOCK zeigen partielle funktionelle Redundanz

Die beschriebenen Effekte sind nicht nur bei Überexpression des membranassoziierten DOCK-Proteins, sondern auch bei membranassoziierten Formen des Proteins gegeben, die jeweils eine funktionsunfähige SH3-Domäne aufweisen. Dieser Effekt lässt sich durch eine funktionelle Redundanz der einzelnen Proteinformen erklären. Die inzwischen aufgedeckten Bindungsverhältnisse einzelner Komplexkomponenten und WASP zu DOCK zeigen, dass sowohl ABI als auch WASP an DOCK binden können. ABI an die N-terminale SH3-Domäne und WASP an die mittlere der drei SH3-Domänen (Bogdan, unveröffentlicht). Zudem bindet ABI ebenfalls WASP. Eine Bindung zusätzlicher relevanter Faktoren für die Regulation des Zytoskeletts wie beispielsweise NIK/MSN an die dritte SH3-Domäne ist möglich (Su *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001). Ob diese Bindungen simultan erfolgen können, ist noch nicht geklärt, die Ursache der funktionellen Redundanz ist jedoch möglicherweise darin begründet.

Das Protein DOCK^{myr}W48K, dessen N-terminale SH3-Domäne unfunktionell ist, zeigt in allen Experimenten den schwächsten Effekt, woraus sich möglicherweise ein Hinweis auf die wichtige Funktion der ABI-Bindung für die AKTIN-Polymerisation ableiten lässt.

Für die Flügel- und Ocellarborsten-Entwicklung konnte kein Effekt der Überexpression des Konstruktes *dock*^{myr}W48K beobachtet werden. Es ist also denkbar, dass die ABI-Bindedomäne in diesem Zusammenhang essentiell ist und die Funktion nicht von einer anderen, intakten Bindedomäne übernommen werden kann. Möglicherweise spielt in diesen Prozessen die WAVE-regulierte AKTIN-Polymerisation eine größere Rolle. Da jedoch die Expressionsstärke verglichen mit den anderen verwendeten Konstrukten nicht überprüft wurde, könnte auch eine geringere Expression die Ursache für den

schwächeren Phänotyp darstellen. Eine Überprüfung dieses Sachverhaltes sollte daher erfolgen.

4.4.1.6 Die erhöhte Aktin-Polymerisation durch Überexpression von membranassoziiertem DOCK führt zu multiplen epidermalen Haaren

Neben den Makro- und Mikrochaeten gibt es eine weitere AKTIN-abhängige Struktur auf Kopf und Thorax von *Drosophila melanogaster*. Diese Strukturen sind die epidermalen Haare. Im Wildtyp entwickelt jede Zelle ein feines Haar. Der Aufbau von Haaren folgt zum Teil den gleichen Prinzipien, wie der von Borsten, jedoch wird eine andere Strategie verfolgt, um die charakteristische Form zu erreichen, wie anhand der Flügelhaare aufgedeckt wurde (Guild *et al.*, 2005). Haare besitzen ein zusätzliches quervernetzendes Protein, VILLIN, das die AKTIN-Filamente in frühen Stadien der Haarentwicklung zu losen Bündeln gruppiert. Diese liegen nicht mit der Plasmamembran assoziiert vor, sondern füllen das Cytoplasma des Haares. Die charakteristische Form der Haare wird durch asymmetrische Addition von Bündeln erreicht.

Der DOCK^{myr}-Phänotyp erstreckt sich auch auf die Morphologie der thorakalen Haare. Die Haare sind gebogen und gespalten, vor allem aber steigt ihre Anzahl deutlich an. Ein vermehrtes Auftreten von epidermalen Haaren konnte auch bei Überexpression der membranassoziierten Form von KETTE beobachtet werden, jedoch nicht bei SRA-1^{myr} und ABI^{myr}. Besonders zu bemerken ist dazu auch, dass dieser Effekt für die Expression der beiden Konstrukte *dock^{myr}W151K* und *dock^{myr}W225K* in einfacher Kopie beobachtet werden konnte, bei *dock^{myr}* jedoch nur nach Expression mehrerer Kopien auftrat. Da für das Konstrukt *dock^{myr}W151K* eine stärkere Expression beobachtet worden war, scheint der Effekt auf die epidermalen Haare, ebenso wie der Effekt auf die mechanosensorischen Borsten, dosisabhängig zu sein. Es ist davon auszugehen, dass eine verstärkte Anzahl epidermaler Haare auf einen Anstieg in der AKTIN-Polymerisation zurückzuführen ist.

Insgesamt ergibt sich aus der morphologischen Analyse der Borsten eine WASP-abhängige positive Regulationswirkung des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes, dessen Membranrekrutierung wahrscheinlich von DOCK vermittelt wird.

4.4.2 KETTE und SRA-1 verändern die synaptische Architektur

Aufschluss über die Verhältnisse der einzelnen Komplexproteine zueinander haben auch Untersuchungen an einem anderen Modellsystem ergeben, den neuromuskulären *junctions* (NMJ). Der Verlust von SRA-1 durch RNAi ähnelt, genau wie bei den Borsten, dem Phänotyp einer hypomorphen Allelkombination von *kette*. Es sind zusätzliche Knospen an den Boutons zu erkennen, was eine gewölbte 3D-Struktur zur Folge hatte, die im Wildtyp nicht erkannt werden kann. Neue Boutons entstehen häufig durch asymmetrische Knospung oder symmetrische Teilung (Zito et al., 1999), was eine intakte Regulation des AKTIN-Zytoskeletts voraussetzt (Luo, 2002). Die beobachteten Phänotypen stimmen mit denen überein, die für WASP-Mutanten beobachtet werden können (Coyle et al., 2004), was für eine WASP-abhängige Aktivierung der AKTIN-Polymerisation durch KETTE und SRA-1 in diesem Zusammenhang spricht. Die Bindung zwischen beiden scheint für die korrekte Funktion wichtig zu sein, da Überexpression einer membranassoziierten Form von SRA-1, der die KETTE-bindende Domäne fehlt, einen Phänotyp hervorbringt, der dem der *loss-of-function*-Phänotypen von KETTE und SRA-1 entspricht. Die Ursache dieser dominant negativen Funktion des Konstruktes ist noch unklar, jedoch wäre denkbar, dass Sra-1 sich selbst direkt bindet, oder indirekt über das Protein RAC Einfluss auf WAVE nimmt. Zumindest für das *Drosophila* SRA-1 konnte eine direkte Selbst-Bindung nicht gezeigt werden (Bogdan, unveröffentlicht). SRA-1 kann jedoch auch FRAGILE X binden, das als translationaler Repressor wirkt und auf diese Weise Einfluss auf die Expression verschiedener Proteine hat. In diesem Zusammenhang ist besonders die Beeinflussung von *profilin* durch FRAGILE X interessant, da hier eine direkte Verbindung zur Zytoskelett-Regulation besteht (Reeve et al., 2005). Ob die Membranrekrutierung in diesem Fall von DOCK vermittelt wird, ist ebenfalls nicht untersucht. Das Adapter-Protein NERVOUS WRECK (NWK) wurde jedoch in Zusammenhang mit der Entwicklung von Synapsen gefunden und bindet WASP (Coyle

et al., 2004). Es könnte ein Verbindungsprotein sein, das für die Rekrutierung in entstehenden Synapsen von Bedeutung ist und die Rolle von DOCK übernimmt.

4.4.3 KETTE und DOCK verändern die Anzahl der mechanosensorischen Borsten

4.4.3.1 Die Spezifizierung der Borsten

Makrochaeten von *Drosophila* entstehen an festgelegten, genau spezifizierten Plätzen, die nicht zwischen verschiedenen Tieren variieren. Das komplette Organ entsteht aus *sensory organ precursor* Zellen (SOPs), die aus einer kleinen Gruppe von Zellen, dem *proneuralen cluster*, selektioniert werden. Alle Zellen innerhalb des *clusters* exprimieren die so genannten proneuralen Gene *achaete* (*ac*) und *scute* (*sc*), die den Zellen die Fähigkeit verleihen, SOPs zu werden (Campuzano und Modolell, 1992 review; Bertrand *et al.*, 2002 review). Die Zellen werden jedoch durch den Prozess der lateralen Inhibition, vermittelt durch den Rezeptor NOTCH und seinen Liganden DELTA, an der Annahme des SOP-Schicksals gehindert (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Simpson, 1997; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Lieber *et al.*, 2002; Chung und Struhl, 2001; Hu *et al.*, 2002; Lopez-Schier und St Johnston, 2002). Die intrazelluläre Domäne von NOTCH gelangt in den Kern und aktiviert in Assoziation mit SUPPRESSOR OF HAIRLESS (SU(H)) die Transkription von Genen des *Enhancer-of-split-Komplex* (*E(spl)-C*) (Bailey und Posakony, 1995; Barolo *et al.*, 2002; Fryer *et al.*, 2002), die ihrerseits die Autostimulation der proneuralen Gene regulieren, was zu einer Unterdrückung des SOP-Zellschicksals in der Zelle führt (Culi und Modolell, 1998; Giagtzoglou *et al.*, 2003). Die Zelle, die das SOP-Schicksal annehmen soll, verliert ihre Sensitivität gegenüber der lateralen Inhibition und exprimiert keine Gene des *E(spl)-C* (Jennings *et al.*, 1995; Koelzer und Klein, 2003).

Im Gegensatz zum NOTCH-Signalweg, der negativ auf die Formation von SOPs wirkt, begünstigt der EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)-Signalweg die SOP-Formation durch Aktivierung der Autostimulation der proneuralen Gene (Culi *et al.*, 2001; zur Lage *et al.*, 2004). Die Signalwirkung dieses Weges wird über die konservierte RAS/RAF/MAPK-Kaskade vermittelt (Culi *et al.*, 2001). Während der Borstenentwicklung nehmen also der NOTCH-Signalweg und der EGFR-Signalweg

antagonistische Positionen ein (Abb. 42). Störungen in beiden Wegen können eine veränderte Anzahl der Makrochaeten zur Folge haben.

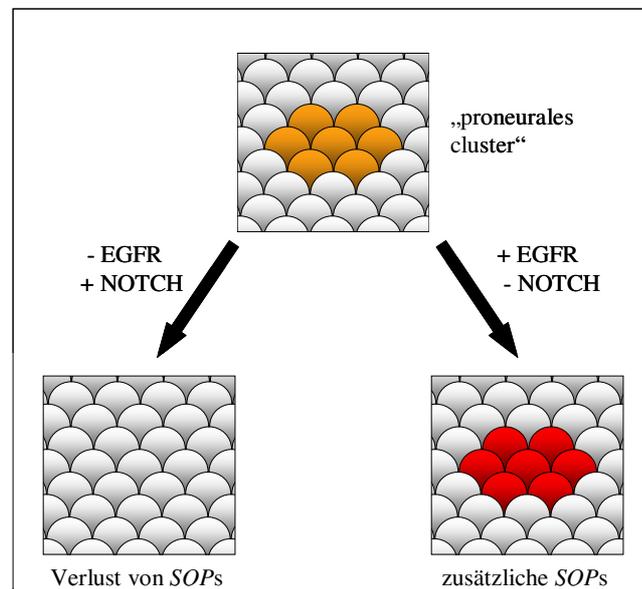


Abb. 42: Die gegensätzliche Wirkung der EGFR- und NOTCH-Signalwege beeinflusst das Zellschicksal im „proneurales cluster“

Interessanterweise scheint die EGFR-Aktivität für die Spezifizierung der Mikrochaeten keine so große Bedeutung zu haben (Culi *et al.*, 2001). Es wurden jedoch Verbindungen zwischen den beiden Signalwegen gefunden. So wird der Faktor GROUCHO, der einen Co-Repressor im NOTCH-Signalweg darstellt, durch MAPK phosphoryliert, was seine Effektivität als Co-Repressor vermindert (Hasson *et al.*, 2005).

Außerdem wurden für einige Schlüssel-Proteine des NOTCH-Signalweges, unter anderem für SU(H), mittlerweile duale, gegensätzlich orientierte Rollen beschrieben (Castro *et al.*, 2005). Hat eine Zelle das SOP-Schicksal angenommen, teilt sie sich mehrfach asymmetrisch. Es entstehen eine Sockel- und eine Borstenzelle aus einer Tochterzelle (pIIa) und eine Hüllzelle und ein Neuron aus der anderen asymmetrisch gebildeten Tochterzelle (pIIb) (Ben-Yaacov *et al.*, 2001; Le Borgne und Schweisguth, 2003 a & b; Bardin *et al.*, 2004). Die Entstehung unterschiedlicher Tochterzellen bei der SOP-Entwicklung beruht auf der AKTIN-abhängigen, asymmetrischen Aktivierung des NOTCH-Signalweges (Gho *et al.*, 1999; Le Borgne und Schweisguth, 2003b; Bardin *et al.*, 2004) und wird durch asymmetrische Verteilung von Determinanten, wie dem

NOTCH-Antagonisten NUMB erreicht (Gho *et al.*, 1999; Bardin *et al.*, 2004). Zugleich wird auch die Verteilung von NEURALIZED, einer weiteren Komponente des NOTCH-Signalweges, asymmetrisch organisiert. Dieses Protein, eine E3UBIQUITIN-LIGASE, wird für die Endozytose des NOTCH-Liganden DELTA benötigt (Le Borgne und Schweisguth, 2003 a & b; Bardin *et al.*, 2004). Dieser Vorgang ist für die Aktivierung des NOTCH-Signals in der benachbarten Zelle unverzichtbar (Le Borgne und Schweisguth, 2003 a & b; Bardin *et al.*, 2004). Neuere Studien zeigen auch für den EGF-Rezeptor eine asymmetrische Verteilung (Sun *et al.*, 2005).

4.4.3.2 Die Expression von *kette*RNAi führt zu einem Verlust der Borsten

Die Expression eines *kette*RNAi-Konstruktes im *scaGal4*-Muster führt wie bereits erwähnt zu fehlenden Makrochaeten auf Kopf und Thorax. Häufig, aber nicht immer, ist der Verlust der Borste auch mit dem Verlust der Sockelzelle verbunden. Diese Phänotypen entsprechen denen, die für *abi*RNAi beobachtet wurden und korrelieren weitgehend mit den morphologischen Modifikationen, die für *wasp*-mutante Fliegen beschrieben worden sind (Ben-Yaacov *et al.*, 2001). Auch diesen Fliegen fehlen viele Makrochaeten und deren Sockelzellen auf Kopf, Thorax und Extremitäten, jedoch geht der Verlust der Makrochaeten mit einem Verlust an Mikrochaeten einher, der weder bei *kette*RNAi, noch bei *abi*RNAi zu beobachten ist (Ben-Yaacov *et al.*, 2001; Stephan, 2004). Es ist daher zu vermuten, dass die Spezifizierung der Mikrochaeten einen anderen, möglicherweise *kette*- und *abi*-unabhängigen Hintergrund besitzt, als es für die Makrochaeten der Fall zu sein scheint. Die Tatsache, dass der Verlust von KETTE und ABI mittels RNAi einen ähnlichen Phänotyp zur Folge hat und dieser Phänotyp mit dem *wasp*-mutanter Fliegen zum Teil übereinstimmt, stützt jedoch die Annahme, dass KETTE und ABI vermutlich gemeinsam mit SRA-1 in diesem Prozess als Proteinkomplex wirken und überdies eine WASP-abhängige AKTIN-Polymerisation steuern.

Mutationen in *wasp* konnten bereits auf die Ursache des Borstenverlustes hin untersucht werden, der jedoch verschiedene Ursachen in verschiedenen Geweben zu haben scheint. Während für den Verlust der Interommatidialborsten in *wasp*-Mutanten Veränderungen der stereotypen *SOP*-Teilungen während der Entwicklung des peripheren Nervensystems ursächlich zu sein scheinen (Ben-Yaacov *et al.*, 2001),

zeigen Untersuchungen an Flügelimaginalscheiben einen Verlust der *SOPs* (Bogdan *et al.*, 2005). Entsprechend der unterschiedlichen Daten könnte die Einflussnahme für verschiedene sensorische Organe zu verschiedenen Zeiten stattfinden.

4.4.3.3 In welcher Entwicklungsphase ist KETTE von Bedeutung?

Für die Entwicklung der thorakalen Makrochaeten scheinen WASP und ABI zu einem frühen Zeitpunkt von Bedeutung zu sein (Bogdan *et al.*, 2005). Nach den bekannten Daten könnte eine übermäßige Hochregulierung des NOTCH-Signalwegs ebenso zum Verlust der Makrochaeten führen, wie eine Störung im EGFR-Signalweg. Möglicherweise könnte in diesem Zusammenhang eine asymmetrische Verteilung von EGFR, wie sie im ZNS von Mäusen gefunden wurde, eine Rolle spielen (Sun *et al.*, 2005). Die korrekte Verteilung kann gegebenenfalls bei Verlust von WASP, ABI und vermutlich auch KETTE nicht gewährleistet werden.

Zudem spielt die Endozytose für die Internalisierung des EGF-Rezeptors eine große Rolle. Für den ARP2/3-Aktivator N-WASP und sein *Drosophila*-Homolog WASP, sowie für ABI wurde eine Funktion bei der Endozytose nachgewiesen (Kessels und Qualmann, 2002; Kessels und Qualmann, 2004; Benesch *et al.*, 2005; Innocenti *et al.*, 2005). *wasp*-mutante Flügelscheiben zeigen jedoch genau wie *abiRNAi*-Flügelscheiben eine reduzierte Anzahl der *SOPs*. Inwieweit die Aktivierung des EGFR-Signalweges durch die Vesikelbildung beeinflusst wird, sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, da sowohl eine verstärkte als auch abgeschwächte Signalwirkung beschrieben wurde (Wiley, 2003). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die EGFR-Endozytose unabhängig von WAVE ist (Innocenti *et al.*, 2005), was gegen eine Rolle von WAVE bei der Spezifizierung der *SOPs* spricht. Eine Interaktion von WASP mit EGFR wurde jedoch auch in einem anderen Zusammenhang gefunden. WASP bildet einen Komplex mit EGFR und vermittelt NCK-abhängig AKTIN-Polymerisation (Kempiak *et al.*, 2005). Außerdem ist die Dichte der Rezeptoren und damit zum Teil ihre Aktivierung von der Organisation des Zytoskeletts abhängig (Schlessinger, 2000). Die phänotypischen Veränderungen in *wasp*-Mutanten sowie in *abiRNAi*- und *ketteRNAi*-Fliegen sind auf diese Weise erklärbar, es folgt daraus jedoch eine *wasp*-Abhängigkeit des Phänotyps, deren Nachweis bisher für die RNAi-induzierten Phänotypen noch aussteht. Zudem

wurde die Anzahl der *SOPs* in *kette*RNAi-Fliegen bisher nicht bestimmt, so dass diese Erklärung des Phänotyps derzeit eine Hypothese darstellt. Der in dieser Arbeit beschriebene *kette*RNAi-Phänotyp ähnelt jedoch so sehr dem *abi*RNAi-Phänotyp und die bisherigen Untersuchungen zeigen so enge Beziehungen zwischen den beiden Proteinen, dass eine Beteiligung von KETTE in einem differierenden Prozess in diesem Zusammenhang fraglich erscheint. Anhand einer phänotypischen Analyse membranassoziierter *abi^{myr}*- und *kette^{myr}*-Konstrukte wurde zudem eine WASP-abhängige Funktion belegt (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2005). Andererseits führt die Expression einer membranassozierten Form von KETTE, im Gegensatz zu einer membranassozierten Form von ABI, nicht zur Entwicklung ektopischer Borsten, was möglicherweise auf einen späteren Einsatz von KETTE im Vergleich zu ABI hindeuten könnte.

Für eine Korrelation der Funktion von KETTE und ABI mit dem EGFR-Signalweg spricht auch die Beobachtung, dass die Mikrochaeten von keinerlei morphologischen Veränderungen betroffen sind, da Aktivität des EGFR-Signalwegs für die Makrochaeten auf dem Notum von großer Bedeutung zu sein scheint, jedoch die Mikrochaetenentwicklung weit weniger beeinflusst (Culi *et al.*, 2001; Diaz-Benjumea und Garcia-Bellido, 1990). WASP könnte in diesem Zusammenhang unabhängig von ABI und KETTE agieren. Neue Untersuchungen an der membranassozierten Form von ABI zeigen keinen Einfluss auf die Verteilung von NOTCH, während die DELTA-Verteilung gestört erscheint (Bogdan, unveröffentlicht). Auch eine verstärkte Aktivierung von MAPK und eine Hyperphosphorylierung konnte bei Expression von *ABI^{myr}* beobachtet werden (Bogdan, unveröffentlicht). Diese Daten lassen ebenfalls zumindest auf eine Beteiligung von ABI an der EGFR-Signaltransduktion schließen und machen eine Beteiligung am NOTCH-Signalweg eher unwahrscheinlich. Phosphorylierungsprozesse sind jedoch auch für die Verbindung der beiden Signalwege von Bedeutung. Eine erhöhte Phosphorylierung von GROUCHO, einem Co-Repressor im NOTCH-Signalweg durch MAPK führt zu einer Reduktion seiner Repressionsfähigkeit (Hasson *et al.*, 2005). Inwieweit die beschriebenen Daten für WASP und ABI auch für KETTE zutreffen, sollte zukünftig untersucht werden. Die Verschmelzung dieser Daten zu einem einheitlichen Bild der *SOP*-Selektion und Differenzierung ist eine Aufgabe der Zukunft, die auch die Frage nach der

Entwicklungsphase, in welcher KETTE von Bedeutung ist, abschließend beantworten muss.

4.4.3.4 Die Überexpression von membranassoziiertem DOCK beeinflusst die Anzahl der Makrochaeten

Auch im Zusammenhang mit der *SOP*-Entwicklung konnte die besondere Bedeutung der Membranrekrutierung der Komplexproteine KETTE, ABI und SRA-1 beobachtet werden (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005). Die Analyse einer membranassoziierten Form von DOCK als potentiell membranrekrutierendem Faktor ergab vor allem bei erhöhter Kopienzahl eine erhöhte Anzahl von Makrochaeten. Der Effekt war jedoch nicht ganz eindeutig, da es Bereiche gab, in denen Makrochaeten fehlten, und Bereiche, in denen zu viele Makrochaeten häufig in enger Nachbarschaft auftraten. Oftmals lagen sie so dicht zusammen, dass ihre Anzahl nicht genau geklärt werden konnte. Die starken morphologischen Veränderungen erschwerten die Analyse der Anzahl, da offensichtlich auch „verschmolzene Sockel“ zweier verschiedener Sockelzellen auftraten. Färbungen der *SOPs* und die Verwendung eines *Su(H)*-GFP, das die Sockelzellen markierte, zeigten jedoch in manchen Bereichen „cluster“ von *SOPs* und Sockelzellen, so dass eine Beteiligung von DOCK bei der Selektion und Spezifizierung der *SOPs* angenommen werden kann. Die Beteiligung von NCK bei der WASP-abhängigen lokalen Aktivierung der AKTIN-Polymerisation als Reaktion auf die Aktivierung des EGFR-Signalweges könnte dabei von Bedeutung sein (Kempiak *et al.*, 2005).

Im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Effekten auf die Anzahl der Makrochaeten ist interessant, dass Analysen von temperatursensitiven *Delta*-Mutanten zum Teil ähnliche Effekte hervorbrachten. Tatsächlich sind für den Verlust von DELTA ebenfalls fehlende und zusätzliche Borsten beschrieben worden (Parody und Muskavitch, 1993). Sowohl die thorakalen als auch die Interommatidialborsten sind von diesem Effekt betroffen (Parody und Muskavitch, 1993), was bei Expression von *dock^{myr}* ebenfalls der Fall ist. Die zeitlichen Intervalle, während denen Multiplikation oder Verlust der Borsten induziert werden, variieren zwischen den Borsten (Parody und Muskavitch, 1993), was den multiplen Einsatz von DELTA während ihrer Entwicklung

widerspiegeln dürfte. Für die Funktion von DOCK könnte aufgrund der vielfältigen Defekte ebenfalls eine multiple Funktion angenommen werden.

4.4.3.5 DOCK ist für die WASP-abhängige AKTIN-Polymerisation während der Spezifizierung von Borsten von Bedeutung

Die große Bedeutung von DOCK für die WASP-abhängige AKTIN-Polymerisation erwies sich vor allem bei Expression des dominant negativen *wasp*^{ACA}-Konstruktes, während die Reduktion von WASP, möglicherweise dosisbedingt, keinen Effekt zeigte. Das Protein WASP^{ACA} verfügt nicht mehr über die Fähigkeit, ARP2/3 zu binden und damit die AKTIN-Polymerisation zu aktivieren. Die gleichzeitige Expression dieses Konstruktes mit der membranassoziierten Form von DOCK führte zu einer eindeutigen Phänokopie der WASP-Mutante. Sowohl Makrochaeten als auch Mikrochaeten gingen verloren. Der Effekt war gegenüber der alleinigen Expression des dominant negativen WASP deutlich verstärkt. Dieses Ergebnis belegt die Abhängigkeit des beobachteten Phänotyps der membranassoziierten DOCK-Proteinform von WASP und ist damit ein deutlicher Hinweis auf die Mediatorfunktion von DOCK bei der Membranrekrutierung des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes. Ein weiterführendes Experiment mit dem membranassoziierten DOCK-Protein, dessen WASP-Bindedomäne (*SH3-middle*) funktionsunfähig ist, steht zur Bestätigung des Sachverhaltes noch aus. Zudem wäre die Analyse eines membranassoziierten Konstruktes interessant, das eine nicht funktionelle N-terminale SH3-Domäne (ABI-Bindedomäne) und eine nicht funktionelle mittlere SH3-Domäne (WASP-Bindedomäne) aufweist.

Während der Effekt von *wasp*^{ACA} im Hintergrund von *dock*^{myr} auf die Anzahl der mechanosensorischen Borsten sehr deutlich war, konnte für die Morphologie der Borsten keine deutliche Veränderung beobachtet werden. Die Makrochaeten nach Expression von WASP^{ACA} sind in ihrer Form nur wenig verändert, es treten jedoch manchmal kürzere Borsten auf. Die Makrochaeten des oben beschriebenen Experimentes ähnelten in ihrer Morphologie jedoch den Borsten der *dock*^{myr}-Fliegen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine weitere WASP-unabhängige Funktion von DOCK bei der morphologischen Entwicklung der Borsten besteht. Die NCK-vermittelte Verknüpfung von verschiedenen Rezeptoren mit dem AKTIN-Zytoskelett über

unterschiedliche Signalkaskaden wurde beschrieben (Buday *et al.*, 2002) und sollte in diesem Zusammenhang näher beleuchtet werden.

4.4.4 DOCK ist ein membranrekrutierender Faktor des KETTE/ABI/SRA-1-Proteinkomplexes während der Borstenentwicklung

Die Beteiligung von DOCK an der Spezifizierung der *SOPs* stützt die Annahme, dass *dock* den membranrekrutierenden Faktor den KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes kodieren könnte und die WASP-Abhängigkeit des Phänotyps spricht ebenfalls für eine Rolle von DOCK als Bindeglied.

Der Phänotyp stellt jedoch keine Phänokopie der Effekte der membranassoziierten Formen von KETTE, ABI und SRA-1 dar, sondern vereinigt Merkmale aller Phänotypen in sich. Die Morphologie der Borsten, besonders auch die gespaltenen Mikrochaeten, spiegeln den Effekt von *KETTE^{myr}* und *SRA-1^{myr}* wieder, während das Auftreten ektopischer Borsten mit eigener Sockelzelle dem Effekt von *ABI^{myr}* gleicht (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005). Es ist nach diesen Experimenten vorstellbar, dass die einzelnen Komplexmitglieder des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes sowie DOCK in manchen Aspekten der Borstenentwicklung zusammenagieren, während sie teilweise auch unabhängige Funktionen übernehmen können. Für alle Phänotypen wurde jedoch eine Abhängigkeit von WASP beobachtet (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005; diese Arbeit).

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und der bisher bekannten Zusammenhänge ist eine Funktion von DOCK als membranrekrutierender Faktor des KETTE/ABI/SRA-1-Komplexes wahrscheinlich. Es wird daher das folgende Modell vorgeschlagen:

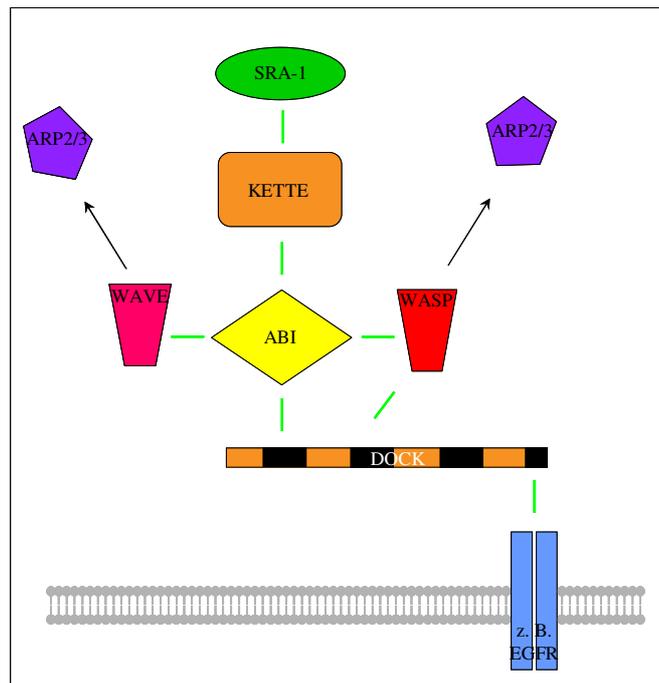


Abb. 43: Modell der Funktion von DOCK unter Einbeziehung der bisher bekannten Beziehungen der einzelnen Proteine untereinander. Die grünen Striche indizieren Bindungen.

Die Phosphorylierung eines Rezeptors wie beispielsweise EGFR in der Membran führt zur Bindung der SH2-Domäne von DOCK, das den daran gebundenen KETTE/ABI/SRA-1-Komplex sowie WASP an die an die Membran rekrutiert und damit die AKTIN-Polymerisation an der Membran aktiviert (Abb. 43). Ob die Bindungen simultan erfolgen, ist ungeklärt, jedoch lässt sich eine partielle funktionelle Redundanz aus den Bindungsmöglichkeiten ableiten. Für die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten ist keine Abhängigkeit von WAVE beschrieben worden und einige Fakten sprechen sogar dagegen (Bogdan und Klämbt, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Bogdan *et al.*, 2005; Innocenti *et al.*, 2005). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass in manchen Prozessen auch die Rekrutierung von WAVE auf diese Weise erreicht wird.

Die vielfältigen Möglichkeiten von DOCK, andere Proteine zu binden, erlauben einen weitläufigen Einsatz des Systems in verschiedenen Entwicklungsprozessen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es weitere Faktoren gibt, die eine Rolle als Mediator einnehmen könnten. So ist es beispielsweise möglich, dass die Funktion von DOCK in der entwickelnden Synapse von NWK übernommen wird (Coyle *et al.*, 2004).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der genetischen, funktionellen und phänotypischen Analyse von Mutationen, die zu einem Defekt in der Musterbildung des embryonalen ZNS von *Drosophila melanogaster* führen. Zum einen wurde das Gen *mummy* einer vorhergesagten Transkriptionseinheit im genomischen Bereich 26D7 zugeordnet. *mummy* kodiert für die UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE (CG9535) und katalysiert eine Reaktion, deren Produkt, das UDP-N-Acetylglucosamin, von essentieller Wichtigkeit für eine große Zahl biologischer Prozesse ist. Es ist Grundbaustein für die Chitinsynthese, für die Glycosylierung verschiedenster Proteine und Glycolipide und für die GPI-Ankersynthese. Eine funktionelle Analyse konnte Effekte von *mummy* sowohl auf die Glycosylierung als auch auf die Herstellung von GPI-Ankern anhand von Beispielen darstellen.

Für das Gen *kette* wurde eine genetische Interaktionspartnersuche sowie eine Untersuchung der Funktion in adulten Geweben durchgeführt. Die Interaktionspartnersuche führte zur Identifizierung von deletierten Bereichen, die potentielle Interaktionspartner aufdecken. Anhand einer RNAi-Analyse wurde für *kette* eine Funktion bei der Entwicklung der mechanosensorischen Borsten beschrieben, die in Kombination mit den bereits bekannten Daten eine Rolle von KETTE bei der WASP-abhängigen AKTIN-Polymerisation belegen. Diese Funktion beruht auf der Bildung eines Komplexes von KETTE, ABI und SRA-1, dessen Membranrekrutierung ein Schlüsselereignis darstellt. Der Interaktionspartner DOCK wurde in diesem Zusammenhang auf seine Funktion getestet. Anhand einer phänotypischen Analyse des Effektes membranassoziierter DOCK-Proteinformen auf die Entwicklung der mechanosensorischen Borsten und der Integration der Ergebnisse in bereits beschriebene Zusammenhänge wurde eine Rolle von DOCK bei der WASP-abhängigen AKTIN-Polymerisation belegt, die für eine Funktion von DOCK als membranrekrutierendes Mediator-Protein spricht.

6 Literatur

- Affolter, M., Nellen, D., Nussbaumer, U., and Basler, K. (1994).** Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase thick veins reveal novel functions of TGF beta homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 120, 3105-17
- Affolter, M., Marty, T., Vigano M. A., and Jazwinska, A. (2001).** Nuclear interpretation of dpp signaling in *Drosophila*. *EMBO Journal* 20(13), 3298-305
- Araujo, S. J., Aslam, H., Tear, G., and Casanova, J. (2005, prior to publication).** mummy/cystic encodes an enzyme required for chitin and glycan synthesis, involved in trachea, embryonic cuticle and CNS development-Analysis of its role in *Drosophila* tracheal morphogenesis
- Arora, K., Dai, H., Kazuko, S. G., Jamal, J., O'Connor, M. B., Letsou, A., and Warrior, R. (1995).** The *Drosophila* schnurri gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. *Cell* 81, 781-90
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995).** Notch Signaling. *Science* 268, 225-232
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999).** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776
- Ashburner, M. (1989).** *Drosophila*, a laboratory handbook. *CSHL press*

- Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995).** Suppressor of Hairless directly activates transcription of Enhancer of Split Complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* 9, 2609-2622
- Bardin, A. J., Le Borgne R., and Schweisguth, F. (2004).** Asymmetric localization and function of cell-fate determinants: a fly's view. *Curr Opin Neurobiol.* 14, 6-14
- Barolo, S., Stone, T., Bang, A. G., and Posakony, J. W. (2002).** Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* 16, 1964-1976
- Baumgartner, S., Martin, R., Chiquet-Ehrismann, R., Sutton, J., Desai, A., Huang, I., Kato, K., and Hromas, R. (1995).** The HEM proteins: a novel family of tissue specific transmembrane proteins expressed from invertebrates through mammals with an essential function in oogenesis. *J. Mol Biol.* 251, 41-49
- Benesch, S., Polo, S., Lai, F., Anderson, K., Stradal, T., Wehland, J., and Rottner, K. (2005).** N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci.* 118, 3103-3115
- Ben-Yaacov, S., Le Borgne, R., Abramson, I., Schweisguth, F., and Schejter, E. D. (2001)** Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling. *J Cell Biol* 152, 1-13
- Berdnik, D. and Knoblich, J. A. (2002).** *Drosophila* Aurora-A is required for centrosome maturation and actin dependent asymmetric protein localisation during mitosis. *Curr Biol.* 12 (8), 640-647
- Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F. (2002).** Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517-530

- Blagg, S. L., Stewart, M., Scambles, C., and Insall, R. H. (2003).** PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.* 13, 1480-1487
- Bogdan, S., Grewe, O., Strunk, M., Mertens, A., and Klämbt, C. (2004).** Sra-1 interacts with Kette and WASP and is required for neuronal and bristle development in *Drosophila*. *Development* 131, 3981-3989
- Bogdan S. and Klämbt, C. (2003).** Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* 130, 4427-4437
- Bogdan, S., Stephan, R., Löbke, C., Mertens, A., and Klämbt, C. (2005).** Abi activates WASP to promote sensory organ development. *Nature Cell biology*
- Bompard, G. and Caron, E. (2004).** Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* 166, 957-962
- 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
- Brose, K., Balnd, 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 axon guidance. *Cell* 96, 795-806
- Brose, T. and Tessier-Lavigne, M. (2000).** Slit proteins: key regulators of axon guidance, axon branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol.* 10, 95-102

- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002).** The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 723-731
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., and Morata, G. (1996).** Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252-255
- Campos-Ortega, J. A. (1993).** Early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. In: *Development of Drosophila*, Bate, C. M./Martinez-Arias, A., eds.: CSH press, 1091-1130
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1997).** The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg New York
- Campuzzano, S. and Modolell, J. (1992).** Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends Genet.* 8, 202-207
- Carrera, P., Abrell, S., Kerber, b., Walldorf, U., Preiss, A., Hoch, M., and Jackle, H. (1998).** A modifier screen in the eye reveals control genes for Kruppel activity in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (18), 10779-10784
- Castro, B., Barolo, S., Bailey, A., and Posakony, J. (2005).** Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless *Development* 132, 3333-3344
- Chen, B., Chu, T., Harms, E., Gerger, J. P., and Strickland, S. (1998).** Mapping of *Drosophila* mutations using site-specific male recombination. *Genetics* 149, 157-163
- Chung, H. M. and Struhl, G. (2001).** Nicastrin is required for Presenilin-mediated transmembrane cleavage in *Drosophila*. *Nat. Cell. Biol.* 3, 1129-1132

- Comer, F. I. and Hart, G. W. (1999).** O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochem Biophys Acta* 1473, 161-171
- Cory, G. O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A. J. (2002).** Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASP to stimulate actin polymerisation and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277, 45115-45121
- Coyle, I. P., Koh, Y. H., Lee, W. C., Slind, J., Fergestad, T., Littleton, J. T., and Ganetzky, B. (2004).** Nervous wreck, an SH3 adapter protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, 41, 521-534
- Culi, J. and Modolell, J. (1998).** Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanisms for sense organ development that is regulated by Notch signalling *Genes Dev.* 5, 996-1008
- Culi, J., Martin-Blanco, E., and Modolell, J. (2001).** The EGF receptor and Notch signaling pathway act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. *Development* 128, 299-308
- Daniels, S. B., McCarron, M., Love, C., and Chovnick, A. (1985).** Dysgenesis-induced instability of rosy locus transformation in *Drosophila melanogaster*: analysis of excision events and the selective recovery of control element deletions. *Genetics* 109, 95-117
- Desai, C. J., Garrity, P. A., Keshishian, H., Zipursky, S. L., and Zinn, K. (1999).** The *Drosophila* SH2 SH3 adaptor protein Dock is expressed in embryonic axons and facilitates synapse formation by the RP3 motoneuron. *Development* 126, 1527-1535

- Devine, W. P., Lubarsky, B., Shaw, K., Luschnig, S., Messina, L., and Krasnow, M. A. (2005, prior to publication).** Requirement for chitin biosynthesis in epithelial tube morphogenesis
- Diaz-Benjumea, F. J. and Garcia-Bellido, A. (1990).** Behavior of cells mutant for an EGF receptor homologue of *Drosophila* in genetic mosaics *Proc. R. Soc. Lond.* 242, 36-44
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002).** Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790-793
- Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1998).** Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11, 1155-1161
- Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1999).** Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J Mol Biol* 292, 741-758
- Ellis, M. C., O'Neill, E. M., and Rubin, G. M. (1993).** Expression of *Drosophila* glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. *Development* 119, 855-65
- Fei, X., He, B., and Adler, P. N. (2002).** The growth of *Drosophila* bristles and laterals is not restricted to the tip or base *J Cell Sci* 115, 3797-3806
- Field, M. C., Moran, P., Li, W., Keller, G. A., and Caras, I. W. (1994).** Retention and degradation of proteins containing an uncleaved glycosylphosphatidylinositol signal *J Biol Chem* 269 (14), 10830-10837

- Fryer, C. J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K. A. (2002).** Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev.* 16, 1397-1411
- 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 USA* 79, 7929-7933
- Galisteo, M. L., Chernoff, J., Su, Y. C., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. (1996).** The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J. Biol. Chem.* 271, 20997-21000
- Garrity, P.A., Rao, Y. M., Salecker, I., McGlade, J., Pawson, T., and Zipursky, S. L. (1996).** *Drosophila* photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adaptor protein. *Cell* 85, 639-650
- Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999).** Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584
- Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K.A., and Delidakis, C. (2003).** Two modes of recruitment of E(Spl) repressors onto target genes. *Development*, 130, 259-270
- Glise, B., Bourbon, H., and Noselli, S. (1995).** hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83, 451-61.
- Golic, K. G. (1991).** Site specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* 252, 958-961.

- Guild, G. M., Connelly, P. S., Ruggiero, L., Vranich, K. A., and Tilney, L. G. (2003).** Long continuous actin bundles in *Drosophila* bristles are constructed by overlapping short filaments. *J Cell Biol.* 162 (6) 1069-1077
- Guild, G. M., Connelly, P. S., Ruggiero, L., Vranich, K. A., and Tilney, L. G. (2005).** Actin filament bundles in *Drosophila* wing hairs: Hairs and bristles use different strategies for assembly. *Molecular Biology of the Cell* 16 (8), 3620-3631
- Gong, C., Stoletov, K. V., and Terman, B. I. (2004).** VEGF treatment induces signaling pathways that regulate both actin polymerisation and depolymerisation. *Angiogenesis* 7 (4), 313-322
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q. (1993).** Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. C. M. Bate and A. Martinez-Arias, (eds.: *CSH press*)
- Groppe, J., Rumpel, K., Economides, A. N., Stahl, N., Sebald, W., and Affolter, M. (1998).** Biochemical and biophysocal characterization of refolded *Drosophila* DPP, a homolog of bone morphogenic proteins 2 and 4. *J Biol Chem* 273 (44), 29052-29065
- Hall, A. (1998).** Rho GTPases and teh actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514
- Harden, N., Ricos, M., Ong, Y. M., Chia, W., and Lim, L. (1999).** Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* 112, 273-84
- Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jin, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A. J., and Paroush, Z. (2005).** EGFR signaling attenuates Graucho-dependent repression to antogonize Notch transkriptional ourput. *Nature Genet.* 37, 101-105

- Herranz, H. and Morrata, G. (2001).** The functions of pannier during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 128, 4837-4846
- Higgs, H. N. and Pollard, T. D. (2000).** Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 150, 1311-1320
- Higgs, H. N. and Pollard, T. D. (2001).** Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 70, 649-676
- Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L., and Zipursky, S. L. (1999).** Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 97, 853-863
- 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
- Ho, H. Y., Rohatgi, R., Ma, L., and Kirschner, M. W. (2001).** CR16 forms a complex with N-WASP in the brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11306-11311
- Ho, H. Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A. M., Le, M., Li, J., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2004).** Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203-216
- Hofbauer, A. (1991).** Eine Bibliothek monoklonaler Antikörper gegen das Gehirn von *Drosophila melanogaster*. *Habilitationsschrift, Universität Würzburg, Germany*

Holt, C. E. and Dickson, B. J. (2005). Sugar codes for axons? *Neuron* 46, 169-172

Hong, Y., Ohishi, K., Kang, J. Y., Tanaka, S., Inoue, N., Nishimura, J., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2003). Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol Biol Cell*. 14 (5), 1780-1789

Hopmann, R. and Miller, K. G. (2003). A balance of capping protein and profilin functions is required to regulate actin polymerisation in *Drosophila* bristle. *Mol Biol Cell* 14, 118-128

Hou, X. S., Goldstein, E. S., and Perrimon, N. (1997). *Drosophila* Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. *Genes Dev* 11, 1728-37

Hu, Y., Ye, Y. and Fortini, M. E. (2002). Nicastrin is required for γ -Secretase cleavage of the *Drosophila* Notch receptor. *Dev. Cell*. 2, 69-78

Hudson, A. M. and Cooley, L. (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*. 156, 677-687

Hummel, T. (1998). Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die für die korrekte Ausbildung des axonalen Musters im embryonalen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* notwendig sind. *Dissertation*

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 (2), 381-389

- Hummel, T., Leifker, K., and Klämbt, C. (2000).** The Drosophila Hem2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organisation. *Genes & Dev* 14, 863-873
- Ikezawa, H. (2002).** Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins *Biol Pharm Bull* 25 (4), 409-417
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., Stradel, T. E., Di fiore, P. P., Carlier, M. F., and Scita, G. (2004).** Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signaling complex. *Nat Cell Biol* 6, 319-327
- Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F., Hertzog, M., Stradal, T., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., Benesch, A., Di Fiore, P., Carlier, M., and Scita, G. (2005).** Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes *Nature Cell Biol.*
- Jacinto, A. and Baum, B. (2003).** Actin in development. *Mech Dev* 120, 1337-1349
- 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, 2412-2422
- Jennings, B., de Celis, J., Delidakis, C., Preiss, A., and Bray, S. (1995).** Role of Notch and achaete-scute complex in the expression of Enhancer of split bHLH proteins. *Development* 121, 3745-3752
- 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

- Kempiak, S. J., Yamaguchi, H., Sarmiento, C., Sidani, M., Ghosh, M., Eddy, R. J., DesMarais, V., Way, M., Condeelis, J., and Segall, J. E. (2005).** A neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerisation that is regulated by cortactin. *J. Biol. Chem.* 280, 5836-5842
- 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, 425-435
- Kessels, M. M. and Qualmann, B. (2002).** Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *Embo J* 21, 6083-6094
- Kessels, M. M. and Qualmann, B. (2004).** The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell Sci* 117, 3077-3086
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and Rosen, M. K. (2000).** Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *Nature* 404, 151-158
- Kinoshita, T. and Inoue, N. (2000).** Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin. Chem. Biol.* 4, 632-638
- Kitamura, T., Kitamura, Y., Yonezawa, K., Totty, N. F., Gout, I., Hara, K., Waterfield, M. D., Sakaue, M., Ogawa, W., and Kasuga, M. (1996).** Molecular cloning of p125Nap1, a protein that associates with a SH3 domain of Nck. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 509-514

- Kitamura, Y., Kitamura, T., Sakaue, H., Maeda, T., Ueno, H., Nishio, S., Ohno, S., Osada, S., Sakaue, M., Ogawa, W. et al., (1997).** Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac. *Biochem J* 322 (Pt 3), 873-878
- 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, 801-815
- Klämbt, C. and Goodman, C. S. (1991).** The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo. *Glia* 4, 205-213
- Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1998).** p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem* 273, 291-295
- Kockel, L., Zeitlinger, J., Staszewski, L. M., Mlodzik, M., and Bohmann, D. (1997).** Jun in Drosophila development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways [published erratum appears in *Genes Dev* 1998 Feb 1;12(3):447]. *Genes Dev* 11, 1748-58
- Koelzer, S. and Klein, T. (2003).** A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of Drosophila. *Development* 130, 1973-1988
- Kramer, K. L. and Yost, H. J. (2003).** Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. *Annu Rev Genet* 37, 461-484

- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B. (2003).** Abi, Sra-1 and Kette control the stability and localisation of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol* 13, 1867-1875
- Le Borgne, R. and Schweisguth, F. (2003 a).** Notch signaling: endocytosis makes delta signal better. *Curr Biol* 13, 273-275
- Le Borgne, R. and Schweisguth, F. (2003 b).** Unequal Segregation of Neuralize Biases Notch Activation during Asymmetric Cell Division. *Developmental Cell* 5, 139-148
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W. (2003).** Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30, 322-9
- Lees, A. D. and Picken, L. E. R. (1944).** Shape in relation to fine structure in the bristles of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 132, 396-423
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Gelbart, W. M., Massague, J., et al. (1995).** *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family. *Cell* 80, 899-908
- Lewis, E. B. and Bacher, F. (1968).** Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *D. I. S.* 43, 193
- Li, W., Fan, J., and Woodley, D. T. (2001).** Nck/Dock: an adaptor between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 20, 6403-6417
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002).** *kuzbanian*-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev.* 16, 209-221

- Lin, D. M. and Goodman, C. S. (1994).** Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13, 507-523.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992).** The genome of *Drosophila melanogaster*. In *Academic Press, Inc.*
- Lopez-Schier, H. and St. Johnston, D. (2002).** Drosophila Nicastrin is essential for the intramembranous cleavage of Notch. *Dev. Cell* 2, 79-89
- Lüer, K., Urban, J., Klämbt, C., and Technau, G. M. (1997)** Induction of identified mesodermal cells by CNS midline progenitors in Drosophila. *Development* 124, 2681-2690
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994).** Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes & Dev* 8, 1787-1802
- Luo, L. (2002).** Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 601-635
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M., and Martinez-Arias, A. (1998).** puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. *Genes Dev* 12, 557-70.
- Martinez-Arias, A. (1993).** Development and patterning of the larval epidermis of Drosophila. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate, Martinez-Arias, A., ed. (New York: CSH Press), pp. 517-608

- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I. M., Medina, M., Saville, S. P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S. et al. (2001).** WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerisation and filopodium formation. *Nat Cell Biol* 3, 484-491
- Mathew, D., Gramates, L. S., Packard, M., Thomas, U., Bilder, D., Perrimon, N., Gorczyca, M., and Budnik, V. (2002).** Recruitment of scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein. *Curr Biol* 12 (7), 531-539
- Menne, T. V., Lüer, K., Technau, G. M., and Klämbt, C. (1997)** CNS midline cells in *Drosophila* induce the differentiation of lateral neural cells. *Development* 124, 4949-4958
- Merzendorfer, H. and Zimoch, L. (2003).** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp. Biol* 206, 4393-4412
- Miki, H. and Takenawa, T. (2003).** Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem (Tokyo)* 134, 309-313
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998 a).** Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391, 93-96
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998 b).** WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganisation induced by Rac. *Embo J* 17, 6932-6941
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000).** IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408, 732-735

- Millard, T. H., Sharp, S. J., and Machesky, L. M. (2004).** Signaling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)- family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380, 1-17
- Mok, M. T., Tay, E., Sekyere, E., Glenn, W. K., Bagnara, A. S., and Edwards, M. R. (2005).** Giardia intestinalis: Molecular characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase *Gene* 357, 73-82
- Moussian, B., Schwarz, H., Bartoszewski, S., and Nüsslein-Volhard, C. (2005).** Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology* 264, 117-130
- Muda, M., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Clemens, J. C., and Dixon, J. E. (2002).** Use of double-stranded RNA-mediated interference to determine the substrates of protein tyrosine kinases and phosphatases *Biochem. J.* 366, 73-77
- Mueller, B. K. (1999).** Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 22, 351-388
- Nellen, D., Affolter, M., and Basler, K. (1994).** Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of *Drosophila* body pattern by decapentaplegic. *Cell* 78, 225-238
- Newsome, T. P., Asling, B., and Dickson, B. J. (2000).** Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye – specific mosaics. *Development* 127, 851-60
- Noselli, S. (1998).** JNK signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Trends Genet* 14, 33-38

- Noselli, S. and Agnes, F. (1999).** Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 466-472
- Notatangelo, L. D. and Ochs, H. D. (2003).** Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganisation, cell trafficking and synapse formation. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 585-591
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschhaus, E., and Kluding, H. (1984).** Mutations affecting the pattern of the Larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch Dev. Biol.* 193, 267-282
- Overton, J. (1967).** The fine structure of developing bristles in wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 122, 367-379
- Parody, T. and Muskavitch, M. (1993).** The Pleiotropic Dunction of *Delta* During Postembryonic Development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 135, 527-539
- Patel, N. H., Snow, P. M., and Goodman, C. S. (1987).** Characterization and cloning of Fasciclin III: A glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988
- Pena-Rangel et al., (2002).** A misexpression study examining dorsal thorax formatin in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160 (3), 1035-1050
- Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Warna, J. L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J. A., Massagué, J., and Hoffman, F. M. (1994).** Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell* 78, 239-250

- Pollard, T. D. (1986).** Rate constants for the reactions of ATP-and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 103, 2747-2754
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003).** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465
- Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D., and Lim, W. A. (2000).** Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290, 801-806
- Preston, C. R. and Engels, W. R. (1996).** P-Element-induced male recombination and gene conversion on *Drosophila*. *Genetics* 144, 1611-1622
- Rao, Y. (2005).** Dissecting Nck/Dock Signaling pathways in Drosophila Visual System. *Int. J. Biol. Sci.* 1, 80-86
- Riesgo-Escovar, J. R. and Hafen, E. (1997 a).** Common and distinct roles of DFos and DJun during Drosophila development. *Science* 278, 669-72
- Riesgo-Escovar, J. R. and Hafen, E. (1997 b).** Drosophila Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes Dev* 11, 1717-27
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A., and Hafen, E. (1996).** The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10, 2759-68
- Ring, J. M. and Martinez Arias, A. (1993).** puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the Drosophila larva. *Dev Suppl*, 251-9

- Rivera, G. M., Briceno, C. A., Takeshima, F., Snapper, S. B., and Mayer, B. J. (2004).** Inducible Clustering of Membrane-Targeted SH3 Domains of the Adaptor Protein Nck Triggers Localized Actin Polymerization. *Curr. Biol.* 14, 11-22
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, d. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., and Pollard, T. D. (2001).** Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294, 1679-1684
- Rogers, S. L., Wiedemann, U., Stuurmann, N., and Vale, R. D. (2003).** Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol* 162, 1079-1088
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999).** The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231
- Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000).** Mechanism of N-WASP activation by Cdc42 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150, 1299-1310
- Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M., and Basler, K. (1995).** An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell* 80, 889-97.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llaser, R., Coulson, D., Drummond, J., et al., (2004).** The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167 (2), 797-813

- Schenck, A., Bardoni, B., Langmann, C., Harden, N., Mandel, J. L., and Giangrande, A. (2003).** CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* 38, 887-898
- Schenck, A., Qurashi, A., Carrera, P., Bardoni, B., Diebold, C., Schejter, E., Mandel, J., and Giangrande, A. (2004).** WAVE/SCAR, a multifunctional complex coordinating different aspects of neuronal connectivity. *Dev. Biol.* 27, 260-270
- Schimmelpfeng, K. (2000).** Genetische Analyse der axonalen Wegfindung im embryonalen ZNS von *Drosophila melanogaster*. *Dissertation*
- Schlessinger, J. (2000).** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225
- 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, 4653-4689
- 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
- Scott, M. P., Zappacosta, F., Kim, E. Y., Annan, R. S., and Miller, W. T. (2002).** Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1. *J Biol Chem* 277, 28238-28246
- Sept, D. and McCammon, J. A. (2001).** Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys, J.* 81, 667-674

- 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
- Simin, K., Bates, E. A., Horner, M. A., and Letsou, A. (1998).** Genetic analysis of *punt*, a type II Dpp receptor that functions throughout the *Drosophila melanogaster* life cycle. *Genetics* 148, 801-13
- Simpson, P. (1997).** Notch signaling in development: on equivalence groups and asymmetric development potential. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 537-542
- Simpson, P., Woehl, R., and Usui, K. (1999).** The development and evolution of bristle patterns in Diptera. *Development* 126, 1349-1364
- Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J., and Ip, Y. T. (1996).** A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 2745-58
- Snow, P. M., Patel, N. H., Harrelson, A. L., and Goodman, C. S. (1987).** Neural-Specific Carbohydrate Moiety Shared by Many Surface Glycoproteins in *Drosophila* and Grasshopper Embryos. *J Neurosci* 7 (12), 4137-4144
- Song, J. and Zipser, B. (1995).** Targeting of neuronal subsets mediated by their sequentially expressed carbohydrate markers. *Neuron* 14, 537-547
- Soto, M. C., Qadota, H., Kasuya, K., Inoue, M., Tsuboi, D., Mello, C. C., and Kaibuchi, K. (2002).** The GEX-2 and GEX-3 proteins are required for tissue morphogenesis and cell migrations in *C. elegans*. *Genes Dev* 16, 620-632

- Staebling-Hampton, K., Laughon, A. S., and Hoffmann, F. M. (1995).** A *Drosophila* protein related to the human zinc finger transcription factor PRDII/MBPI/HIV-EP1 is required for dpp signaling. *Development* 121, 3393-403
- Steffen, A., Rottner, k., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T. E. (2004).** Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo J* 23, 749-759
- 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, 225-230
- Stephan, R. (2004).** Untersuchungen zur Funktion des Kette/Sra-1/Abi Proteinkomplexes in *Drosophila*. Diplomarbeit
- Stoeckli, E. T. and Landmesser, L. T. (1998).** Axon guidance at choice points *Curr Opin Neurobiol.* 8 (1)73-79
- Stradal, T., Courtney, K. D., Rottner, K., Hahne, P., Small, J. V., and Pendergast, A. M. (2001).** The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerisation at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr Biol* 11, 891-895
- Stradal, T., Rottner, K., Disnanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G. (2004).** Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends in Cell Biol.*, 14 (6), 303-311
- Strunk, J. M. (2001).** Versuche zur Klonierung des *Drosophila* Gens *cabrio*. Diplomarbeit

- Su, Y. C., Han, J., Yu, S., Cobb, M., and Skolnik, E. Y. (1997).** NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* 16 (6), 1279-1290
- Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002).** Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* 3, 645-658
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (2002).** Spatial and temporal regulation of actin polymerisation for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 51(3), 113-122
- Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2003).** Regulation of cortical actin networks in cell migration. *Int Rev Cytol* 229, 245-286
- Sun, Y., Goderie, S. K., and Temple, S. (2005).** Asymmetric Distribution of EGFR Receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells *Neuron* 45, 873-886
- Sved, J. A., Robson, M. K., and Svoboda, Y. H. (1995).** P-element-induced male recombination can be produced in the *Drosophila melanogaster* by combining end-deficient element in trans. *Genetics* 139, 1601-1610
- Takenawa, T. and Miki, H. (2001).** WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114, 1801-1809
- Tal, T., Vaizel-Ohayon, D., and Schejter, E. D. (2002).** Conserved interactions with cytoskeletal but not signaling elements are an essential aspect of *Drosophila* WASp function. *Dev Biol* 243, 260-271

- Tilney, L. G., Conelly, P. S., Smith, S., and Guild, G. M. (1996).** F-actin bundles in *Drosophila* bristles are assembled from modules composed of short filaments. *J Cell Biol* 135, 1291-1308
- Tilney, L. G., Conelly, P. S., Vranich, K. A., Shaw, M. K., and Guild, G. M. (1998).** Why are two different cross-linkers necessary for actin bundle formation in vivo and what does each cross-linker contribute? *J Cell Biol* 143, 121-133
- Tilney, L. G., Conelly, P. S., Vranich, K. A., Shaw, M. K., and Guild, G. M. (2000a).** Actin filaments and microtubules play different roles during bristle elongation in *Drosophila*. *J Cell Sci* 113, 1255-1265
- Tilney, L. G., Conelly, P. S., Vranich, K. A., Shaw, M. K., and Guild, G. M. (2000b).** Regulation of actin filament cross-linking and bundle shape in *Drosophila* bristles. *J Cell Biol* 148, 87-100
- Tilney, L. G., Connelly, P. S., Ruggiero, L., Vranich, K. A., and Guild, G. M. (2003).** Actin Filament Turnover Regulated by Cross-linking Accounts for the Size, Shape, Location, and Number of Actin Bundles in *Drosophila* Bristles. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3953-3966
- Tilney, L. G., Connelly, P. S., Ruggiero, L., Vranich, K.A., Guild, G. M., and DeRosie, D. (2004).** The role actin filaments play in Providing the Characteristic Curved Form of *Drosophila* Bristles. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5481-5491
- Tonning, A., Helms, S., Schwarz, H., Uv, A.E., and Moussian, B. (2005, prior to publication).** Mummy has multiple functions during defferentiation of apical extracellular matrices in the *Drosophila* embryo.

- Tootle, T. L. and Rebay, I. (2005).** Post-translational modification influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *BioEssays* 27, 285-298
- Trombetta, E. S. and Parodi, A. J. (2005).** Glycoprotein reglycosylation. *Methods* 35, 328-337
- Tsuboi, D., Qadota, H., Kasuja, K., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2002).** Isolation of the interacting molecules with GEX-3 by a novel functional screening. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 697-701
- Welch, M. D. and Mullins, R. D. (2002).** Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 247-288
- Wiley, H. S. (2003).** Trafficking of the ErbBreceptors and its influence on signaling. *Exp. Cell. Res.* 284, 78-88
- 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
- Wolf, C., Gerlach, N., and Schuh, R. (2002).** *Drosophila* tracheal system formation involves FGF-dependent cell extensions contacting bridge-cells. *EMBO Rep* 3, 563-8
- Wright, J. W. and Copenhaver, P.F. (2000).** Different isoforms of fasciclin II play distinct roles in the guidance of neuronal migration. *Dev. Biol.* 225, 59-78

- Wulfkuhle, J. D., Petersen, N. S., and Otto, J. J. (1998).** Changes in the F-Actin Cytoskeleton during Neurosensory Bristle Development in *Drosophila*: The Role of Singed and Forked Proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 40, 119-132
- Yamaguchi, Y. (2001).** Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12, 99-106
- Yamamoto, A., Suzuki, T. and Sakaki, Y. (2001).** Isolation of the hNAP1BP which interacts with human Nap1 (NCKAP1) whose expression is downregulated in Alzheimer's disease. *Gene* 271,159-169
- Yan, A. and Lennarz, W. J. (2005).** Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem* 280, 3121-3124
- Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S., and Kiehart, D. P. (1993).** Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev* 7, 29-41
- Xia, Y. and Karin, M. (2004).** The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases *Trends in Cell Biol.* 14, 94-101
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993).** Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-37
- Zachara, N. E. and Hart, G. W. (2002).** The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev* 102, 431-438

Zallen, J. A., Cohen, Y., Hudson, A. M., Cooley, L., Wieschhaus, E., and Schejter, E. D. (2002). SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol* 156, 689-701

Zeitlinger, J., Kockel, L., Peverali, F. A., Jackson, D. B., Mlodzik, M., and Bohmann, D. (1997). Defective dorsal closure and loss of epidermal decapentaplegic expression in *Drosophila fos* mutants. *Embo J* 16, 7393-401

Zipkin, I. D., Kindt, R. M., and Kenyon, C. J. (1997). Role of a new Rho family member in cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 90, 883-894

Zito, K., Parnas, D., Fetter, R. D., Isakoff, E. Y., and Goodman, C. S. (1999). Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 22, 719-729

zur Lage, P., Powell, L., Prentice, D., McLaughlin, P., and Jarman, A. (2004). EGF Receptor Signaling Triggers Recruitment of *Drosophila* Sense Organ Precursors by Stimulating Proneural Gene Autoregulation. *Developmental Cell* 7, 687-696

Anhang I: Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.** ZNS-Phänotypen der *kette*-und *mummy*-Mutationen in Homozygose im Vergleich zum Wildtyp
- Abb. 2.** Vergleich des *mummy*-Phänotyps mit der wildtypischen Situation
- Abb. 3.** Regulation des dorsalen Schlusses
- Abb. 4.** Vergleich des *kette*-Phänotyps mit der wildtypischen Situation
- Abb. 5.** Darstellung der Struktur von WASP und WAVE
- Abb. 6.** Modell der AKTIN-Zytoskelettorganisation
- Abb. 7.** Darstellung der unveränderlichen Positionen der Makrochaeten auf dem Thorax (A) und der *SOP*-Zelllinie (B)
- Abb. 8.** Die genomische Region um 26D
- Abb. 9.** Darstellung der Transkriptionseinheit *CG9535* und des biochemischen Prozesses, in dem die UDP-N-ACETYLGLUCOSAMIN-PYROPHOSPHORYLASE von Bedeutung ist
- Abb. 10.** Konfokale Untersuchung des Effektes von *mummy* auf die Verteilung von GFP GPI
- Abb. 11.** *Western Blot* aus Embryolysaten (GFP GPI)
- Abb. 12.** *Western Blot*-Analyse (FASII)
- Abb. 13.** *Western Blot*-Analyse (FASIII)
- Abb. 14.** Klonale Analyse unter Verwendung des *kette*-FRT-Chromosoms und Überprüfung des Effektes durch Reinigung des Chromosoms
- Abb. 15.** Augenimaginalscheibe des Genotyps *hsFLP; UAS kette/armGal4; armlacZ FRT80B/kette^{J4-48} FRT80B*
- Abb. 16.** Schematische Darstellung des Klonierungsprinzips unter Verwendung des pWIZ-Vektors
- Abb. 17.** Quantifizierung der *kette*RNAi-Phänotypen auf 25 °C
- Abb. 18.** Ausprägungen des *kette*RNAi-Phänotyps in verschiedenen Geweben bei 29 °C
- Abb. 19.** *Western Blot* aus Fliegenlysaten
- Abb. 20.** Modifikationen des hypomorphen *kette*-Phänotyps
- Abb. 21.** Modifizierung des Augenphänotyps des *kette^{myr}*-Konstruktes, getrieben mit *GMRGal4* (Abschwächung)

Anhang

- Abb. 22.** Modifizierung des Augenphänotyps des *kette^{myr}*-Konstruktes, getrieben mit *GMRGal4* (Verstärkung)
- Abb. 23.** Phänotypen der neuromuskulären *Junction* (NMJ)
- Abb. 24.** Übersicht der membranverankerten *dock*-Konstrukte
- Abb. 25.** *S2R+*-Zellen, transfiziert mit den myristilierten *dock*-Konstrukten.
- Abb. 26.** „Aggregat“-Phänotyp der *S2R+*-Zellen
- Abb. 27.** Effekte der *dock*-Konstrukte, getrieben mit *scaGal4*, auf Kopf, Thorax und Flügel
- Abb. 28.** Quantitative Erfassung der Borstenphänotypen (Kopf)
- Abb. 29.** Auszählungsergebnisse der Borstenphänotypen (Thorax)
- Abb. 30.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Phänotypen der thorakalen mechanosensorischen Borsten nach Expression der *dock*-Konstrukte mit *scaGal4*
- Abb. 31.** Die Beeinflussung der frühen Borstenentwicklung durch die Expression des Konstruktes *dock^{myr}W151K*
- Abb. 32.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Haare auf dem Thorax heterozygoter *scaGal4; dock^{myr}W151K*-Fliegen
- Abb. 33.** Flügelphänotypen des *dock^{myr}*-Konstruktes, getrieben mit *scaGal4*
- Abb. 34.** Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Augenphänotypen nach Expression verschiedener *dock^{myr}*-Konstrukte mit *scaGal4*
- Abb. 35.** Dosiseffekt des Konstruktes *dock^{myr}#51-6* bei 25 °C, getrieben mit *scaGal4*.
- Abb. 36.** Analyse gespaltener Makrochaeten
- Abb. 37.** Verschiedene Prozesse innerhalb der Entwicklung mechanosensorischer Borsten werden durch die Expression von zwei Kopien *dock^{myr}* durch *scaGal4* beeinflusst.
- Abb. 38.** Der Effekt von zwei Kopien *dock^{myr}*, getrieben mit *scaGal4*, auf die Anzahl der *sensory organ precursor (SOP)*-Zellen
- Abb. 39.** Phänotypische Untersuchung der Interaktionen von DOCK mit SCAR/WAVE und WASP anhand der mechanosensorischen Borsten.
- Abb. 40.** Interaktionen von WASP^{ΔCA} mit DOCK^{myr}
- Abb. 41.** Modell der GPI-Ankersynthese
- Abb. 42.** Die gegensätzliche Wirkung der EGFR- und NOTCH-Signalwege beeinflusst das Zellschicksal im „proneuralen cluster“
- Abb. 43.** Modell der Funktion von DOCK

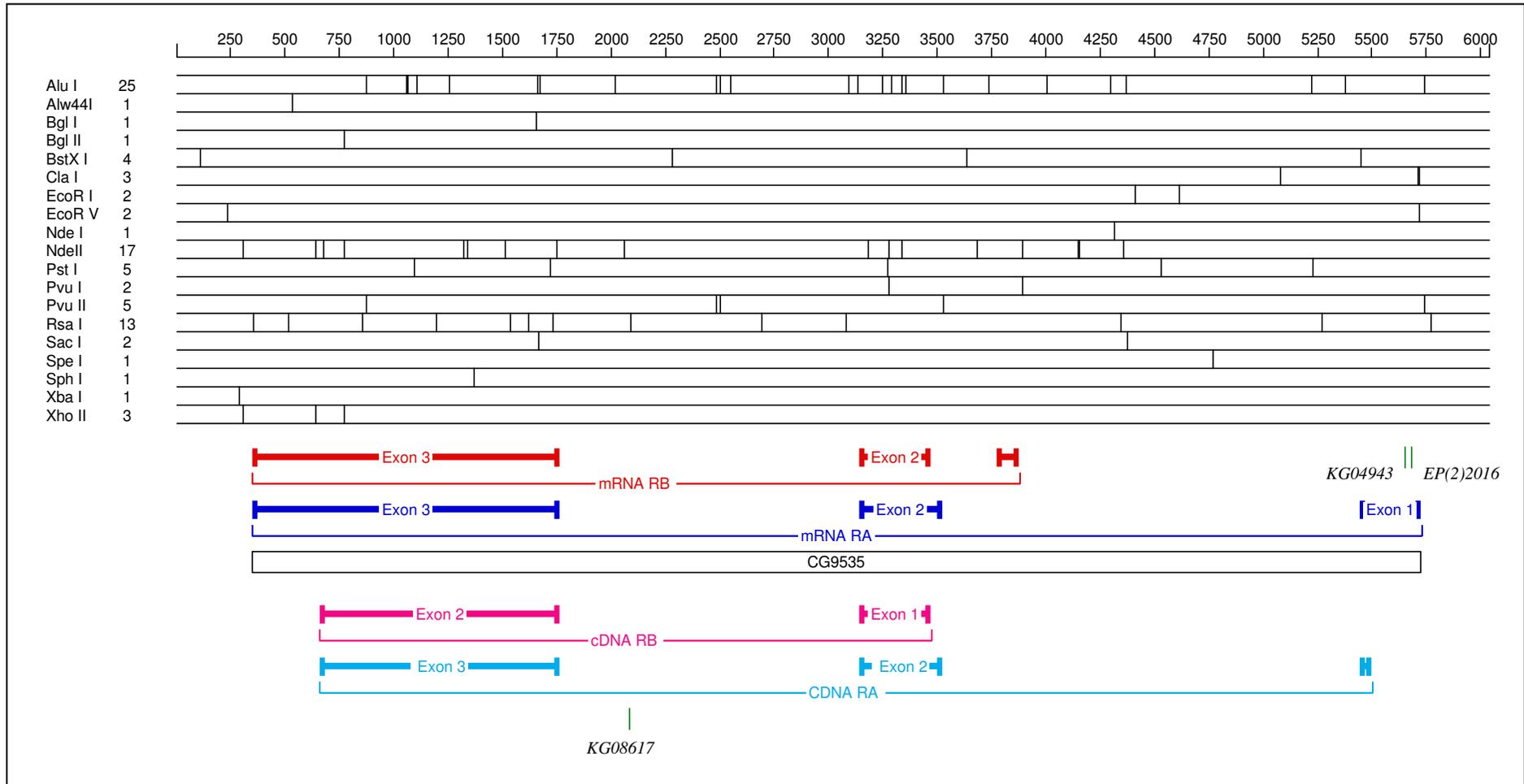
Anhang II: Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
AB	<i>antibody</i> (Antikörper)
AIS	Augen-Antennen-Imaginalscheibe
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APF	<i>after puparium formation</i> (nach der Verpuppung)
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
cDNA	copy DNA
CRIB-Domäne	<i>CDC42 and RAC interactive binding domain</i>
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonucleotid
EDTA	Ethyl-diaminetetraacetat
EMS	Ethylmethylsulfonat
EST	Exprimiertes Sequenzmotiv
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd

FIS	Flügelimaginalscheiben (auch WID)
Fix	Fixierlösung
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (Grün fluorenszierendes Protein)
GMR	Glass Multimer Reporter
GS	<i>goat serum</i> (Ziegen Serum)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IS	Imaginalscheiben
ISN	intersegmentaler Nerv
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
kb	Kilobasen
mAB	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MeOH	Methanol
MG	Mittelliniengliazelle
min	Minuten
ML	Mittellinie
M&M	Material und Methoden
MNB	Medianer Neuroblast
MP1	<i>median precursor</i> (mediane Vorläuferzelle)
MWP	Multiwell-Platte
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
n. d.	nicht bestimmt
NMJ	<i>neuromuscular junctions</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
pAB	<i>polyclonal antibody</i> (polyklonaler Antikörper)

pBS	Bluescript Vektor (Stratagene)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,3 % Triton
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
PT	Phänotyp
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	<i>RNA-interference</i>
RNAse	Ribonuclease A
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SN	Segmentaler Nerv
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UMI	<i>unpaired median interneurons</i> (unpaare mediane Interneurone)
ü. N.	über Nacht
VUM	<i>Ventral Unpaired Median</i> (Neurone der Mittellinie)
WID	<i>wing imaginal discs</i> (Flügelimaginalscheiben, auch FIS)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

Anhang III: Karte des *CG9535*. Eingetragen sind die *mRNA* sowie die *cDNA* der beiden Isoformen des Gens gemäß den Angaben in der *flybase*. Die Lokalisationen der drei im Gen gelegenen *P*- bzw. *EP*-Elementinsertionen sind angegeben. Die zugehörige Sequenz ist im Folgenden als **Anhang IV** aufgeführt.



GTAAATTTTATAAGAAACCAAGAGCATTACATAATCAGATAGATAGTTAATATATTCIGAGATATTCIGGATACAAAAATAATGACTTCT
----- 90
CATTTAAAATATTCCTTGGTTCCTGTAATGTATTAGTCTATCTCAATTATATAAGACTCTATAAGACCTAIGTTTTTATTACTGAAGA

BstX I

TAGCAAAAGAACTTCCAACATAAATGGGTTTACATAGTTAAGGTAACCTCTTTTCTTTAGAACTCAAGTTGGCAGAAAAACAAGAGGTTTGT
----- 180
ATCGTTTTCTTGAAGGTTGATTTACCCAAATGTATCAATTCATTGAGAAAAGAAATCTTGAGTTCAACCGTCTTTTGTCTCCAAACA

EcoR V

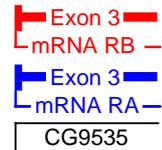
TTGCCAGCAATTCCTTTTATATGATTAGTCCATCCAACAAGACATTTCCCTGATATCTATTTAACACCTTGTAAATAGAGAATGGCGC
----- 270
AACGGTCTGTTAACGAAAATATACTAATCAGGTAGGTTGTTCGTAAAGGGACTATAGATAAATGTGGAACATTTATCTCTTACCGCG

Xba I

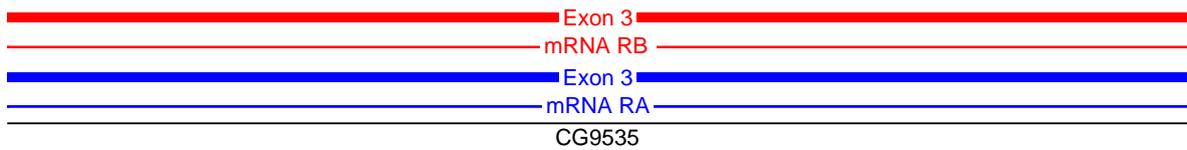
NdeI
Xho II

Rsa I

TTGTTCAAATATGGGATTTGGTCTAGAGTATTTCTGCAAAAGATCCATTGCTTGACCAAGAAGTGAATAATCAATCGCTTGGCCGTACTAA
----- 360
AACAGTTTTATACCTTAACCAGATCTCATAAAGACGTTTTCTAGGTAACGAACTGGTCTTCACTTTTAAGTTAGCGAACCGGCATGATT



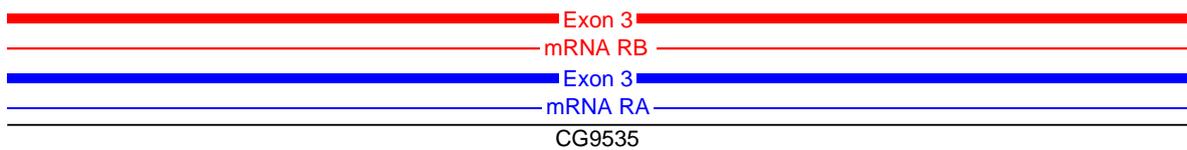
TAATTTTGTATTTTACAACATATTTAAAATATTCATATCATTACATGTTCTATATATGTATATATTCACATTACGATTCACAAATTATT
----- 450
ATTA AAAACATAAAAATGTTGTATAATTTTATAAGTATAGTAAATGTACAAGATATATAACATATATAAGTGTAAATGCTAACGTGTTAATAA



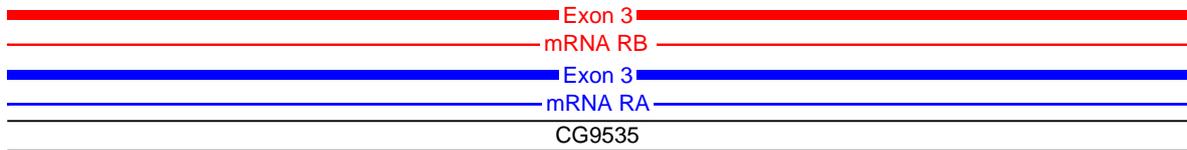
Rsa I

Alw44I

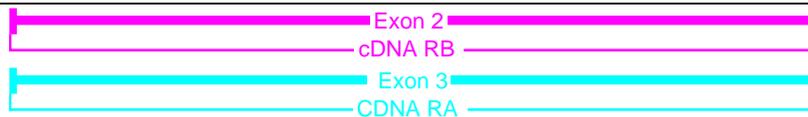
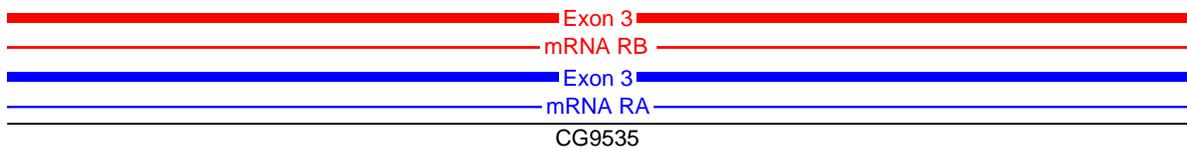
TCAAAAACGAAAATAAATCAACGGACACAATAGGTAACAAATTTTACAAGTCTCCTTTAAGTACTGAAATCAATGGAATTTCCGTGCA
----- 540
AGTTTTTGTCTTTTATTTAGTTGCCIGTGTATCCATTGTTTAAAAATGTTTCAGAGGAAATTCATGACTTTAGTTACCTTAAAGGCACGT



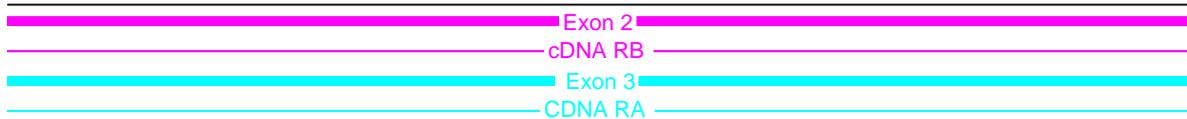
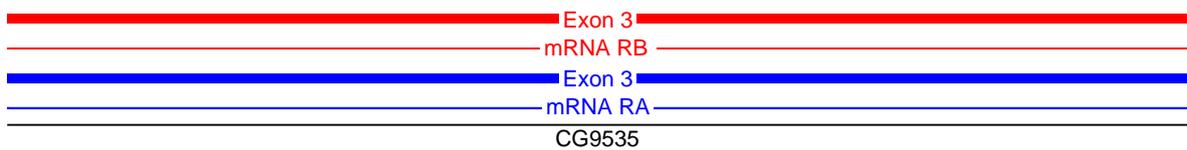
CTAACTACAGTTTGGGGAATCATAAAGTTCATCAACGGTATACGAAAGATTACAAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCATCAGTCT 630
GATTGATGTCAAACCCCTTAGTATTTCAAGTAGTTGCCATATGCTTCTAAATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTICAGA



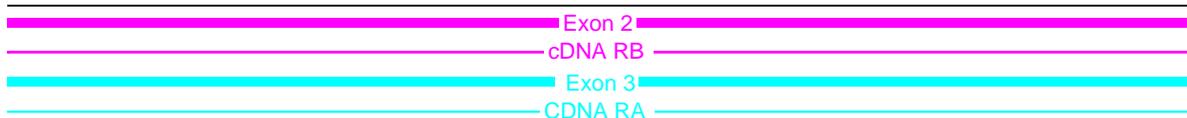
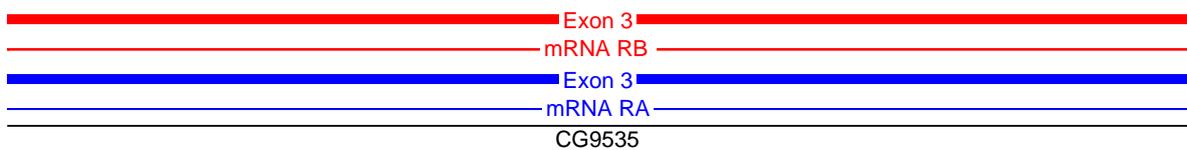
ATGCGTCCATGCAGATCCCCTACATCTTAAAGGTGTCGGTGCAGGGATCGCGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTG 720
TACGCAGGTACGTTCTAGGGGATGTAGAATTTCCACAGGCACGTTCCCTAGCCCGACAGGGCGTCCATCTGCCCTGACCACCTTGTCTGAAC



CCCTCCACATGCGAGGCGAGATTTCTCGCCGGCGTAGGTGACGAAGGGCGAGATCTCGCAGACTTCGCCATGCACAATGCCACCGGCGCT 810
GGGAGGTGTACGCTCCGCTCTAAGAGCGCGCCATCCACTGCTTCCCGCTCTAGAGCGTCTGAAGCGGTACGTTGTACGGTGGCCGCGGA

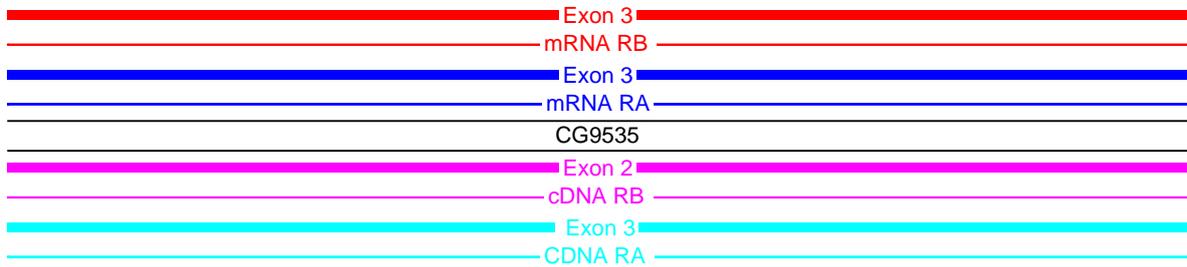


TGCATATACTTCTTGTGCAGGCGATGGAGGTCCGAGCGGGCAGTACTGGGGCAATCCTTGCCAGCTGCATCGGAGTTCITTAGCGCGCTG 900
AGCTATATGAAGAACCGTCCGCTACCTCCAGGCTCGCCCGTCATGACCCCGTTAGGAACGGTCGACGTAGCCTCAAGAAATCGCGCGAC



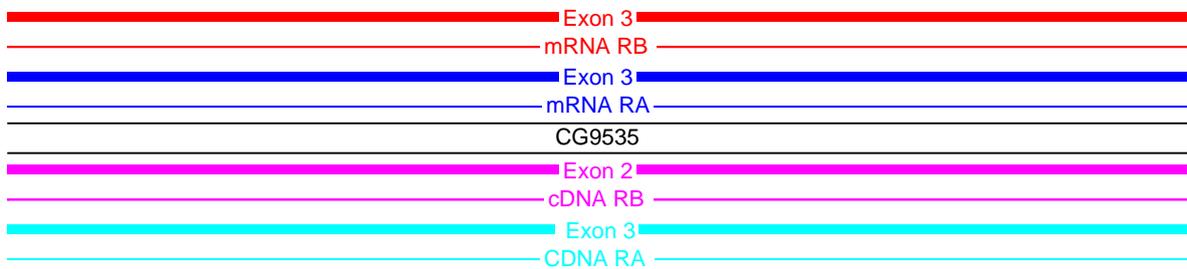
AACTCTTCGTCGCGTGGCAGTTCATGGCCACGAACTTCTGGGGGAACTCGAAGACGTCAAAGACAAACTTCTCTATCTTGATGCCGTTCT
TTGAGAAGCAGCGCACCGTGAAGGTACCGGTGCTTGAAGACCGCTTGAGCTTCTGCAGTTTCTGTTTGAAGAGATAGAAGTACGGCAAG

990



GGCTTGTTCGGCGTTAGACGCTTGCCGGCGTTGTGTACTGAAATCAATGGAATTTCCGTGCCTAACTACAGTTTGGGGAATCATAAAGT
CCGAACAGCCCGCAATCTGCGAACGGCCGCAACACATGACTTTAGTTTACCTTAAAGGCACGTGATTGATGTCAAACCCCTTAGTATTTCA

1080

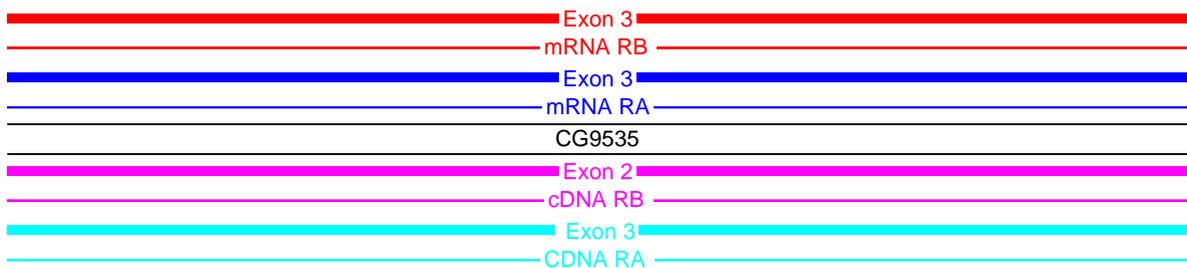


NdeII
Xho II

NdeII

TCATCAACGGTATACGAAAGATTTACAAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCCATCAGTCTATGCGTCCATGCAGATCCCTTACATCTT
AGTAGTTGCCATATGCTTCTTAAATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTTCAGATACGCAGGTACGCTCTAGGGGATGTAGAA

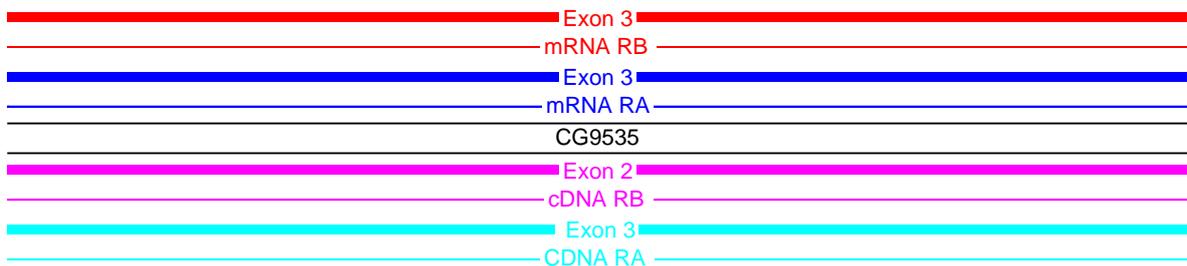
1170

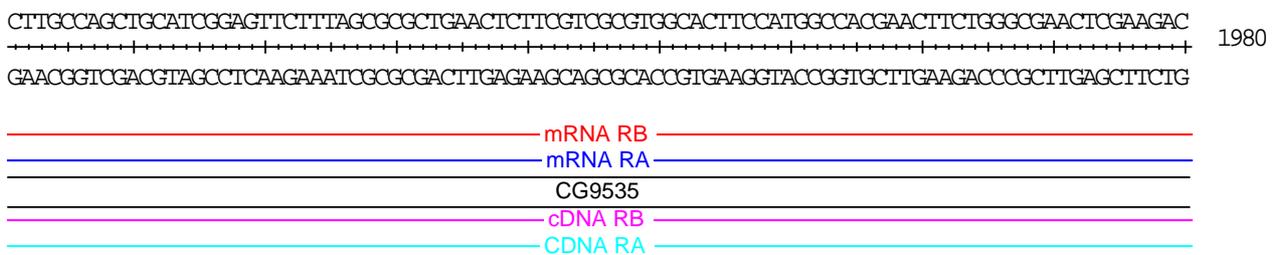
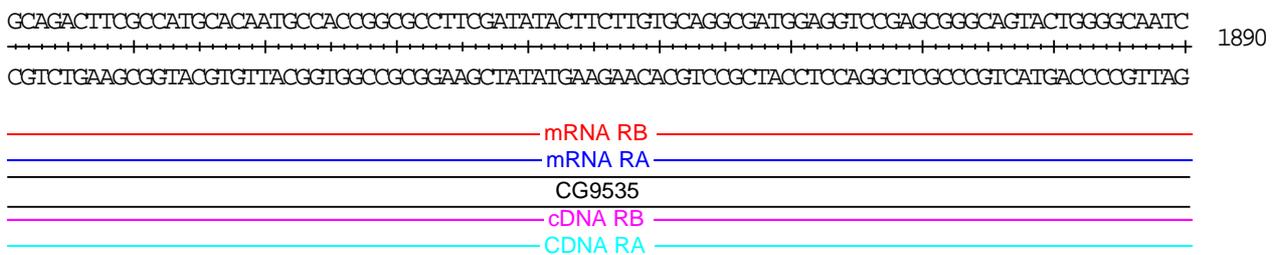
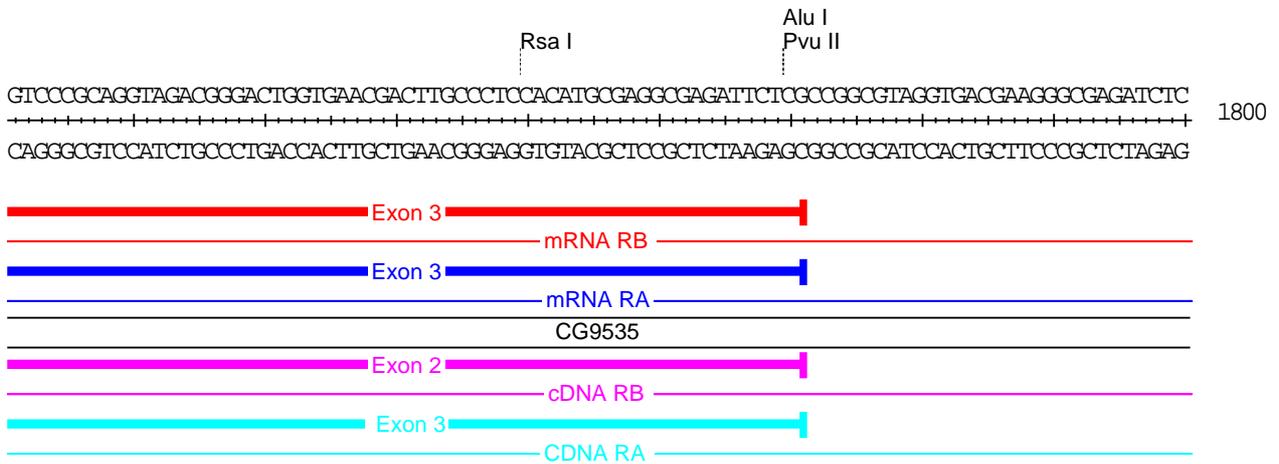
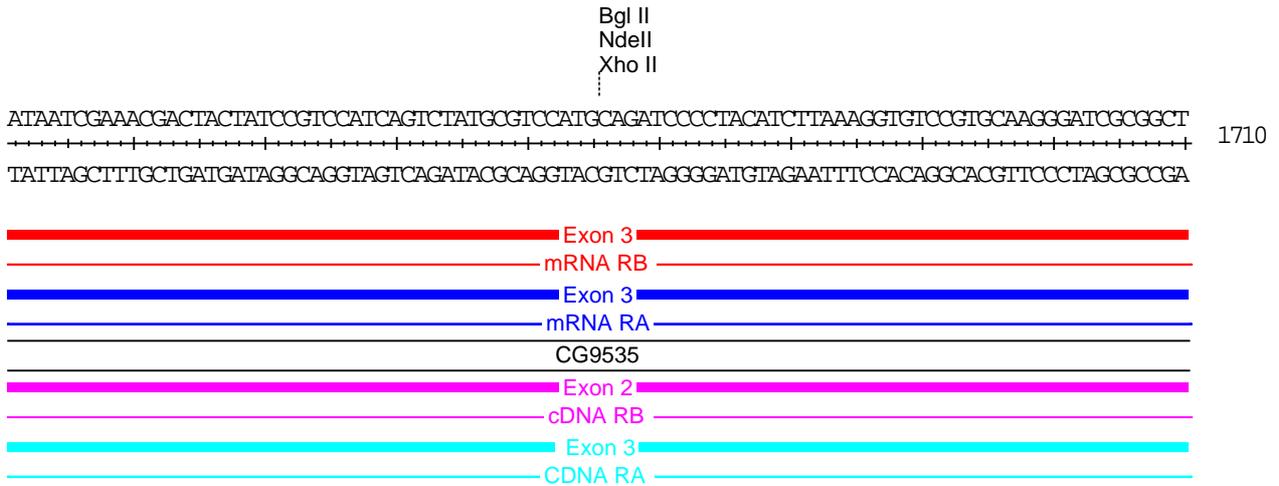


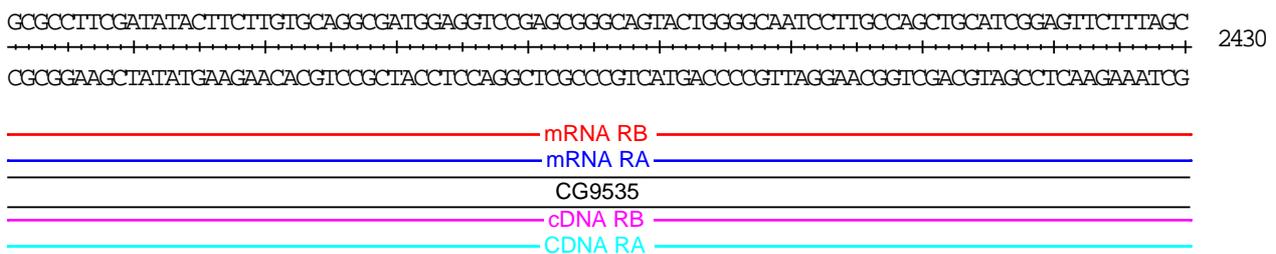
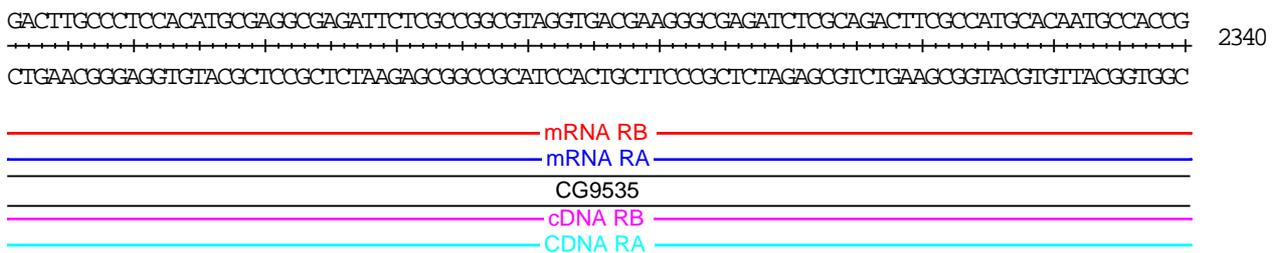
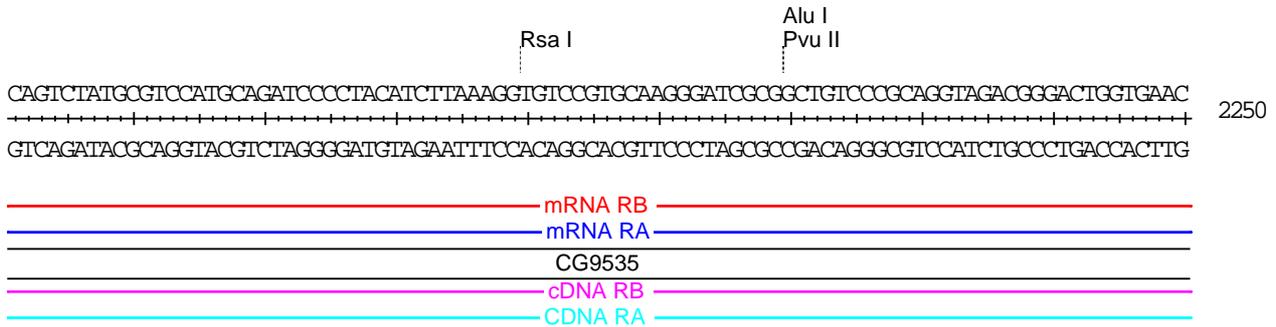
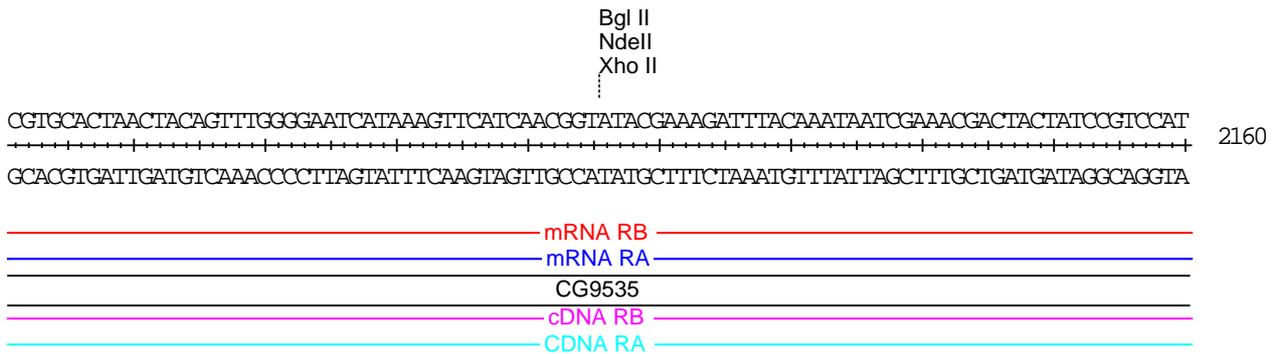
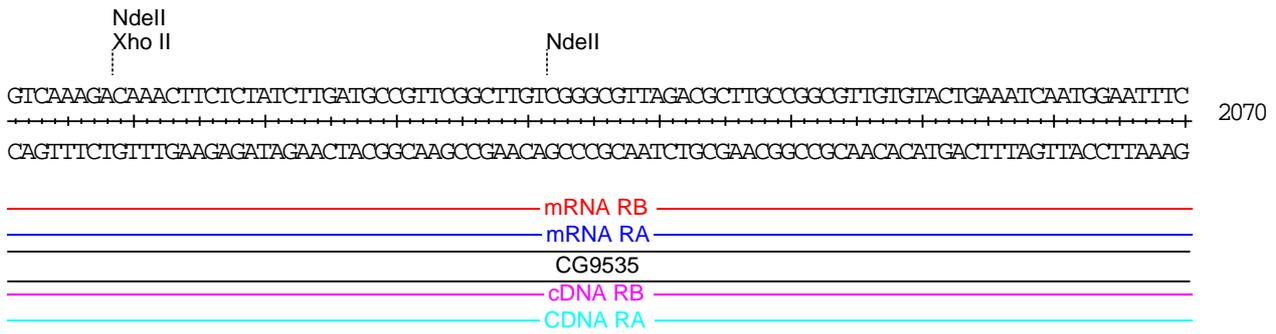
Bgl II
NdeII
Xho II

AAAGGIGTCCGTCGAAGGGATCGCGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTGCCCTCCACATGCGAGGCGAGATTCTCGC
TTTCCACAGGCACGTTCCCTAGCGCCGACAGGGGCTCCATCTGCCCTGACCACTTGCTGAACGGGAGGTGTACGCTCCGCTCTAAGAGCG

1260



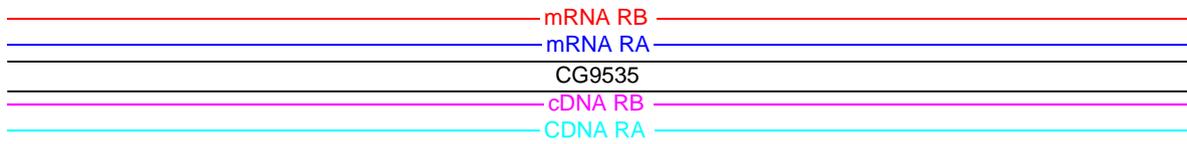




NdeI
Xho II
NdeI

GCGCTGAACCTCTTCGTGCGTGGCACTTCCATGGCCACGAACCTTCTGGGCGAAGCTCGAAGACGTCAAAGACAACTTCTCTATCTTGATG
CGCGACTTGAGAAGCAGCGCACCGTGAAGGTACCGGTGCTTGAAGACCCGCTTGAGCTTCTGCAGTTTCTGTGTTGAAGAGATAGAACTAC

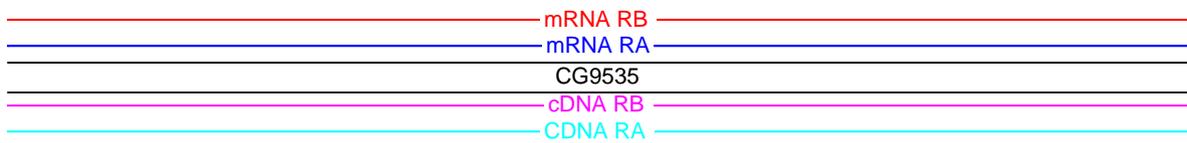
2520



Bgl II
NdeI
Xho II

CCGTTCCGCTTGTTCGGCGTTAGACCGCTTGCCGGCGTTGTGTACTGAAATCAATGGAATTTCCGTGCACTAACTACAGTTTGGGGAATCA
GGCAAGCCGAACAGCCCGCAATCTGCGAACGGCCGCAACACATGACTTTAGTTACCTTAAAGGCACGTGATTGATGTCAAACCCCTTAGT

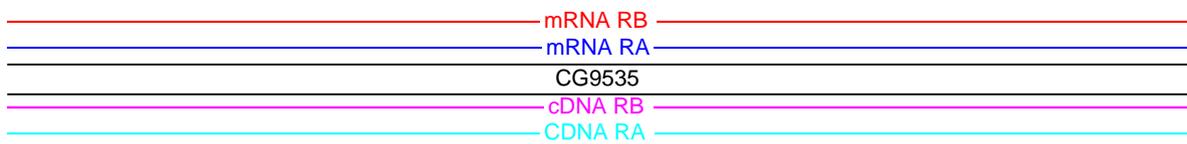
2610



Rsa I
Alu I
Pvu II

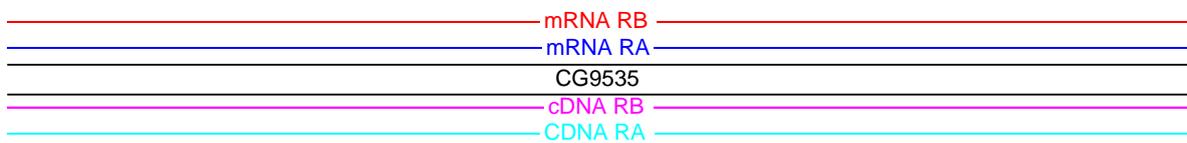
TAAAGTTTCATCAACGGTATACGAAAGATTTACAAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCCATCAGTCTATGCGTCCATGCAGATCCCCTA
ATTTCAAGTAGTTGCCATAATGCTTTCTAAATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTTCAGATACGCAGGTACGCTCAGGGGAT

2700



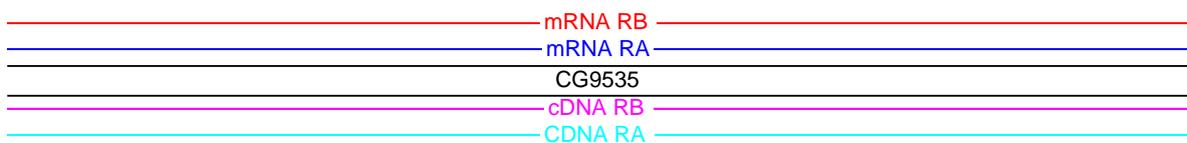
CATCTTAAAGGTGTCCGTGCAAGGGATCGCGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTGCCTCCACATGCGAGGCGAGAT
GTAGAATTTCCACAGGCACGTTCCCTAGCGCCGACAGGGCGTCCATCTGCCCTGACCCTTGTCTGAACGGGAGGTGTACGCTCCGCTCTA

2790



TTCTCGCCGGCTAGGTGACGAAGGGCGAGATCTGCAGACTTCGCCATGCACAATGCCACCGGCGCTTCGATATACTTCTTGTGCGAGC
AGAGCGGCCGATCCACTGCTTCCCGCTCTAGAGCGTCTGAAGCGGTACGTTGTTACGGTGGCCGCGGAAGCTATATGAAGAACACGTTCCG

2880



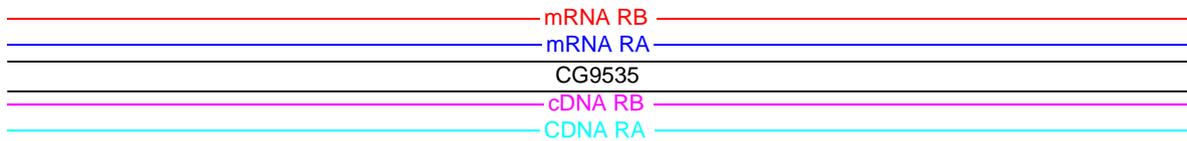
NdeI
Xho II

NdeI

GATGGAGGTCGAGCGGGCAGTACTGGGGCAATCCTTGCCAGCTGCATCGGAGTTCCTTAGCGCGCTGAACCTCTCGTCGCGTGGCACTT

CTACCTCCAGGCTCGCCCGTCATGACCCCGTTAGGAACGGTCGACGTAGCCTCAAGAAATCGCGGACTTGAGAAGCAGCGCACCCGTGAA

2970

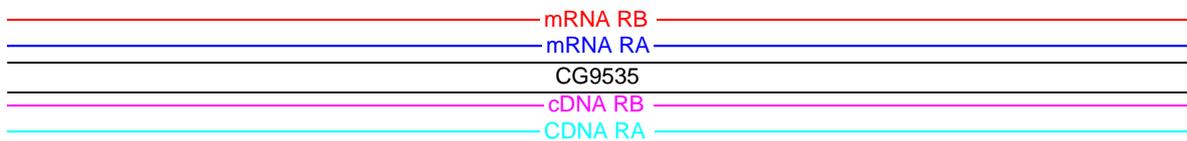


Bgl II
NdeI
Xho II

CCATGGCCACGAACTTCTGGGCGAACTCGAAGACGTCAAAGACAAACTTCTCTATCTTGATGCCGTTTCGGCTTGTTCGGGCGTTAGACGCT

GGTACCGGTGCTTGAAGACCCGCTTGAGCTTCTGCAGTTCCTGTTTGAAGAGATAGAAGTACGGCAAGCCGACAGCCCGCAATCTGCGA

3060



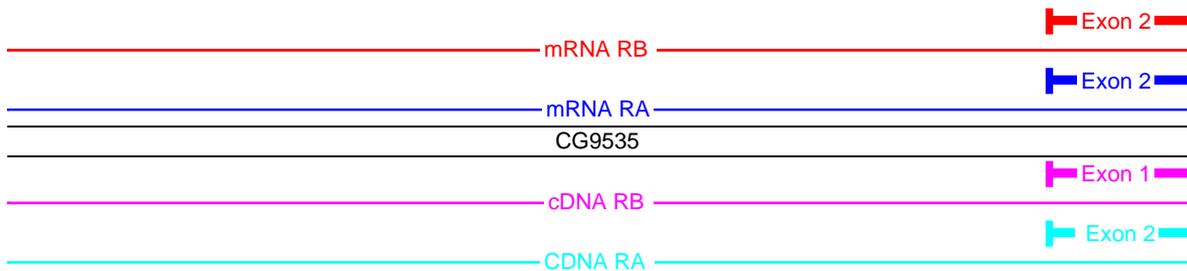
Rsa I

Alu I
Pvu II

TGCCGGCGTTGTGTACTGAAATCAATGGAATTTCCGTGCACTAACTACAGTTCCTGGGAATCATAAAGTTCATCAACGGTATAACGAAAGAT

ACGGCCGCAACACATGACTTTAGTTACCTTAAAGGCACGTGATTGATGTCAAACCCCTTAGTATTTCAAGTAGTTGCCATATGCTTTCCTA

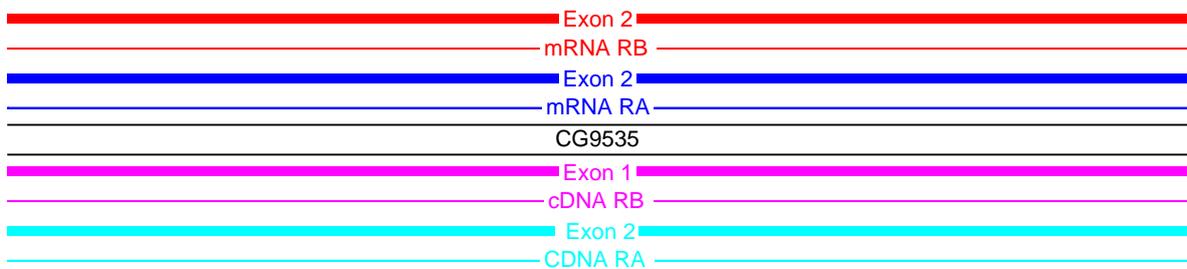
3150



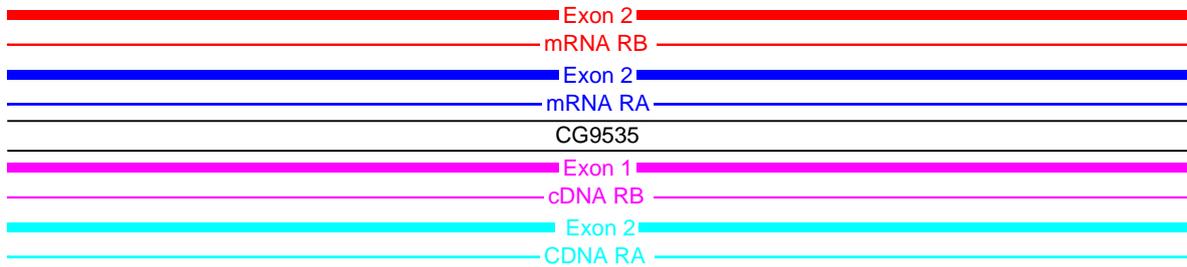
TTACAAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCCATCAGTCTATGCGTCCATGCAGATCCCCACATCTTAAAGGTGTCGGTGCAGGGGATC

AATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTCAGATACGCAGGTACGTCAGGGGATGTAGAATTTCCACAGGCACGTTCCCTAG

3240



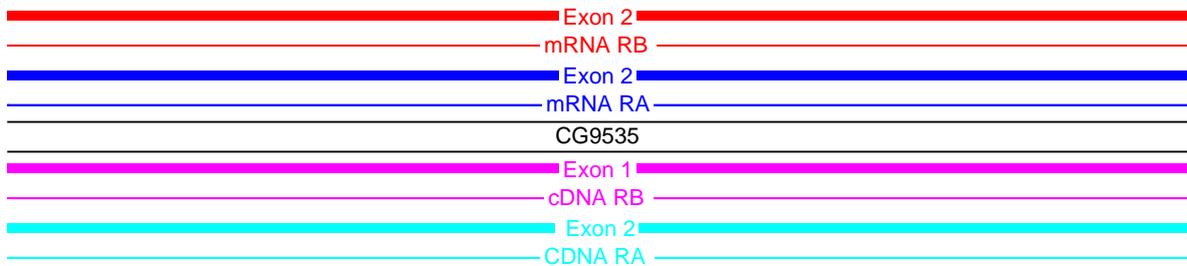
CGGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTTGCCCTCCACATGCGAGGCGAGATTCTCGCCGGCGTAGGTGACGAAGGGCGA 3330
CGCCGACAGGGCGTCCATCTGCCCTGACCACTTGTCTGAACGGGAGGTGTACGCTCCGCTCTAAGAGCGGCCGCATCCACTGCTTCCCGCT



NdeI
Xho II

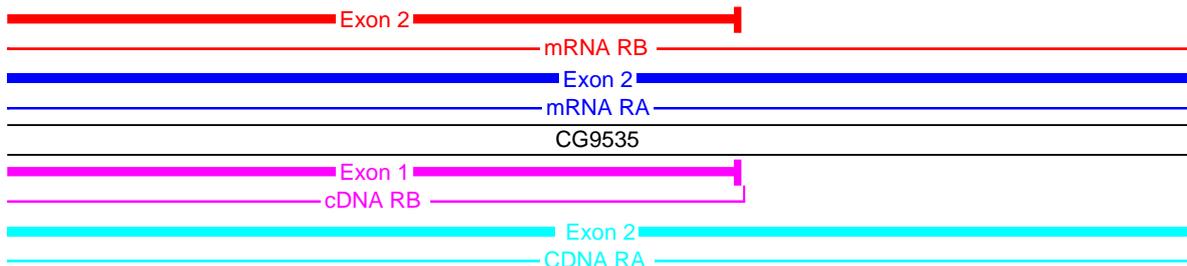
NdeI

GATCTCGCAGACTTCGCCATGCGACAATGCCACCGCGCCCTTCGATATACTTCTTGTGCAGGCGATGGAGGTCGAGCGGGCAGTACTGGG 3420
CTAGACGGTCTGAAGCGGTACGTTGTTACGGTGGCCGCGAAGCTATATGAAGAACACGTCGCTACCTCCAGGCTCGCCCGTTCATGACCC



Bgl II
NdeI
Xho II

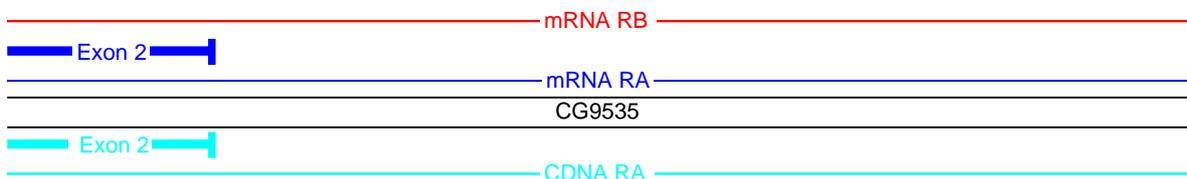
GCAATCCTTGCCAGCTGCATCGGAGTTCCTTAGCGCGCTGAACCTCTTCGTCGCGTGGCACTTCCATGGCCACGAACTTCTGGGCGAACTC 3510
CGTTAGGAACGGTCGACGTAGCCTCAAGAAATCGCGCACTTGAGAAGCAGCGCACCGTGAAGGTACCGGTGCTTGAAGACCCGCTTGAG



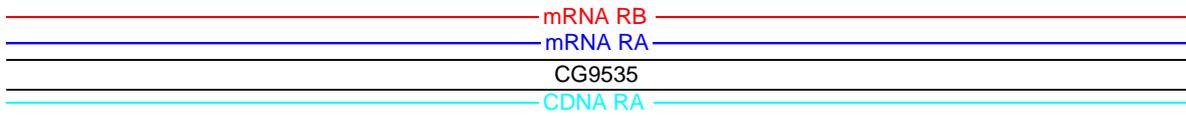
Rsa I

Alu I
Pvu II

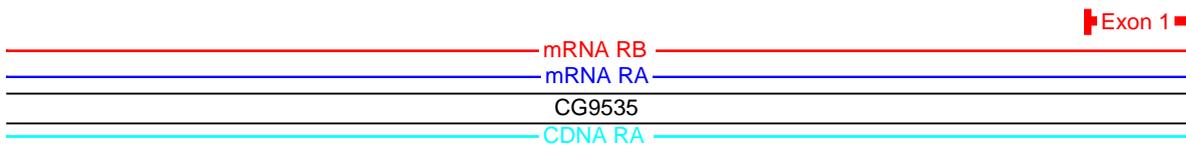
GAAGACGTCAAAGACAAACTTCTCTATCTTGATGCCGTTGGCTTGTTCGGGCGTTAGACGCTTGCCTGGCGTGTGTACTGAAATCAAATGG 3600
CTTCTGCAGTTTCTGTGTTGAAGAGATAGAACTACGGCAAGCCGAACAGCCCGCAATCTGCGAAGCGCGCAACACATGACTTTAGTTACC



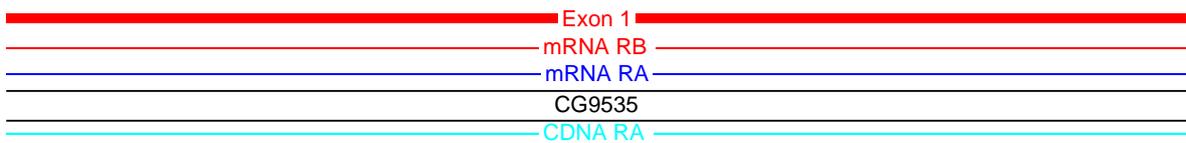
AATTTCCGTGCACTAACTACAGTTTGGGGAATCATAAAGTTTCATCAACGGTATACGAAAGATTTACAAATAATCGAAACGACTACTATCC 3690
TTAAAGGCACGTGATTGATGTCAAACCCCTTAGTATTTCAGTAGTGTCCATATGCTTTC TAAATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGG



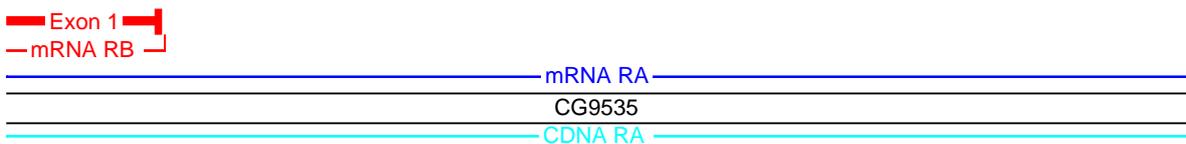
GTCCATCAGTCTATGCGTCCATGCAGATCCCCTACATCTTAAAGGIGTCCGTGCAAGGGATCGGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTG 3780
CAGGTAGTCAGATACGCAGGTACGCTCTAGGGGATGTAGAATTTCCACAGGCACGTTCCCTAGCGCCGACAGGGCGTCCATCTGCCCTGAC



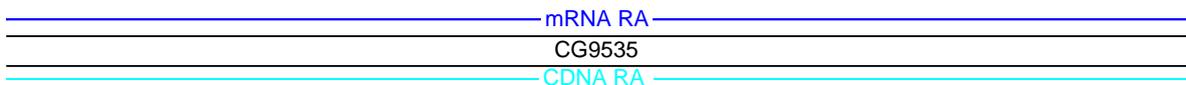
GTGAACGACTTGGCCCTCCACATGCGAGGCGAGATTCTCGCCGGCGTAGGTGACGAAGGGCGAGATCTCGCAGACTTCCGCATGCACAATG 3870
CACTTGTCTGAACGGGAGGTGTACGCTCCGCTCTAAGAGCGGCCGATCCACTGCTTCCCGCTCTAGAGCGTCTGAAGCGGTACGTGTTAC



CCACCGCGCCCTTCGATATACTTCTTGTGCAGGCGATGGAGGTCCGAGCGGGCAGTACTGGGGCAATCCTTGCACGCTGCATCGGAGITC 3960
GGTGGCCGCGAAGCTATATGAAGAACAGTCCGCTACCTCCAGGCTCGCCGTCATGACCCCGTTAGGAACGGTTCGACGTAGCCTCAAG



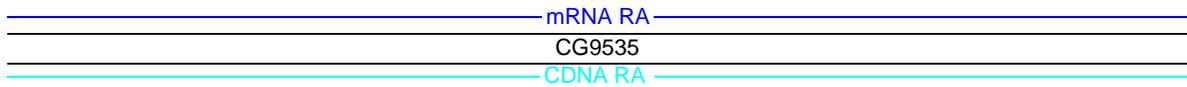
TTTAGCGCGCTGAACTCTTCGTCGCGTGGCACTTCCATGGCCACGAACCTTCTGGGCGAATCGAAGACGTC AAGACAACTTCTCTATC 4050
AAATCGCGGACTTGAAGAAGCAGCGCACCGTGAAGGTACCGGTGCTTGAAGACCCGCTTGAGCTTCTGCAGTTTCTGTTTGAAGAGATAG



TTGATGCCGTTTCGGCTTGTTCGGCGTTAGACGCTTCCCGGCGTTGTGTACTGAAATCAATGGAATTTCCGTGCACTAACTACAGTTTGGG 4140
AACTACGGCAAGCCGAACAGCCCGCAATCTGCGAACGGCCGCAACACATGACTTTTAGTTACCTTAAAGGCACGTGATTGATGTCAAACCC



GAATCATAAAGTTCATCAACGGTATAACGAAAGATTTACAAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCCATCAGTCTATGCGTCCATGCAGAT 4230
CTTAGTATTTCAAGTAGTTGCCATATGCTTTC TAAATGTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTCAGATACGCAGGTACGTCCTA



NdeII
Xho II

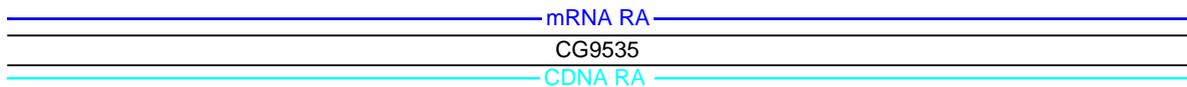
NdeII

CCCCTACATCTTAAAGGTGTCGGTGC AAGGGATCGCGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTGCCCTCCACATGCGAGG 4320
GGGGATGTAGAATTTCCACAGGCACGTTCCCTAGCGCCGACAGGGCGTCCATCTGCCCTGACCACCTTGCTGAACGGGAGGTGTACGCTCC



Bgl II
NdeII
Xho II

CGAGATTCTCGCCGGCGTAGGTGACGAAGGGCGAGATCTCGCAGACTTCGCCATGCACAATGCCACCGGGCGCTTCGATATACTTCTTGT 4410
GCTCTAAGAGCGGCCGATCCACTGCTTCCCGCTCTAGAGCGTCTGAAGCGGTACGTGTTACGGTGGCCGCGAAGCTATATGAAGAACA



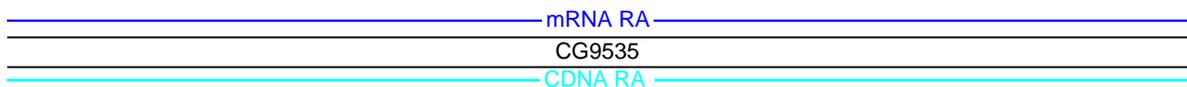
Rsa I

Alu I
Pvu II

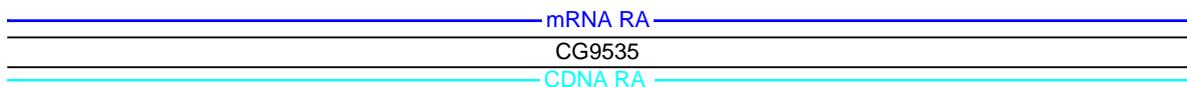
GCAGCGATGGAGGTCCGAGCGGGCAGTACTGGGGCAATCCTTGCCAGCTGCATCGAGTTCCTTAGCGCGCTGAACCTCTCGTCCGGTGG 4500
CGTCCGCTACCTCCAGGCTCGCCCGTCA TGACCCCGTTAGGAACGGTTCGACGTAGCCTCAAGAAATCGCGCGACTTGAGAAGCAGCGCAC



GCACTTCCATGGCCACGAACCTCTGGGCGAACTCGAAGACGTCAAAGACAAACTTCTCTATCTTGATGCCGTTCCGGCTTGTCCGGCGTTA 4590
CGTGAAGGTACCGGTGCTTGAAGACCCGCTTGAGCTTCTGCAGTTTCTGTTTGAAGAGATAGA AACTACGGCAAGCCGAACAGCCCGCAAT



GACGCTTGCCGGCGTTGIGTACTGAAATCAATGGAATTTCCGTGCACTA ACTACAGTTTGGGGAATCATAAAGTTCATCAACGGTATAACG 4680
CTGCGAACGGCCGCAACACATGACTTTAGTTACCTTAAAGGCACGTGATGATGTC AAACCCCTTAGTATTTCAAGTAGTTGCCATATGC



NdeII
Xho II

NdeII

AAAGATTTACAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCATCAGTCTATGCGTCCATGCAGATCCCCFACATCTTAAAGGIGTCCGTGCAA
TTTCTAAATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTCAGATACGCAGGTACGTCTAGGGGATGTAGAATTTCCACAGGCACGTT

4770

mRNA RA

CG9535

CDNA RA

Bgl II
NdeII
Xho II

GGGATCGCGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTGCCCTCCACATGCGAGGCGAGATTTCTCGCCGGCGTAGGTGACGAA
CCCTAGCGCCGACAGGCGTCCATCTGCCCTGACCACCTTGTCTGAACGGGAGGTGTACGCTCCGCTCTAAGAGCGGCCGCATCCACTGCTT

4860

mRNA RA

CG9535

CDNA RA

Rsa I

Alu I
Pvu II

GGCGGAGATCTCGCAGACTTCGCCATGCACAATGCCACCGCGCCTTCGATATACTTCTTGTGTCAGCGATGGAGGTCGAGCGGGCAGT
CCCGCTCTAGAGCGTCTGAAGCGGTACGTGTACGGTGGCCGCGGAAGCTATATGAAGAACACGTCCGCTACCTCCAGGCTCGCCCGTCA

4950

mRNA RA

CG9535

CDNA RA

ACTGGGCAATCCTTGCCAGCTGCATCGGAGTTCTTTAGCGCGCTGAACCTTCGTCGCGTGGCACTTCCATGGCCACGAACCTCTGGGC
TGACCCCGTTAGGAACGGTCGACGTAGCCTCAAGAAATCGCGGACTTGAGAAGCAGCGCACCGTGAAGGTACCGGTGCTTGAAGACCCG

5040

mRNA RA

CG9535

CDNA RA

GAACTCGAAGACGTCAAAGACAAACTTCTCTATCTTGATGCCGTTCCGGCTTGTCCGGCGTTAGACGCTTGCCGGCGTTGTGTACTGAAAT
CTTGAGCTTCTGCGAGTTCTGTGTGAAGAGATAGAACTACGGCAAGCCGAACAGCCCGCAATCTGCGAACGGCCGCAACACATGACTTTA

5130

mRNA RA

CG9535

CDNA RA

NdeII
Xho II

NdeII

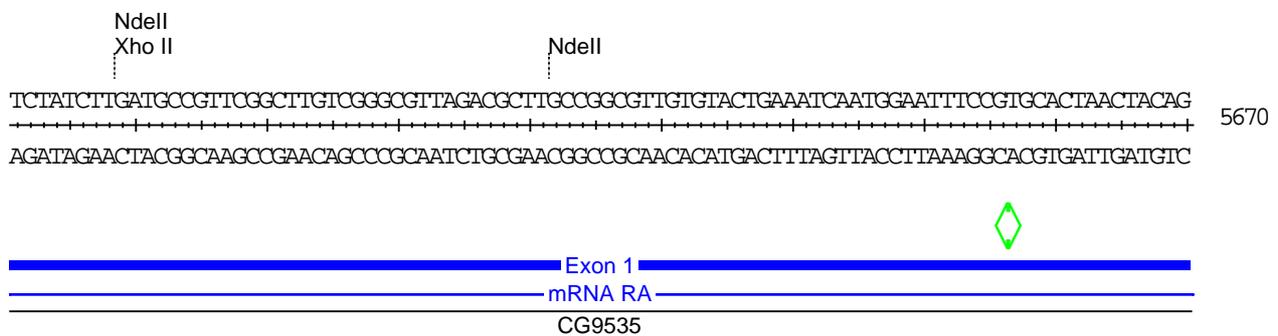
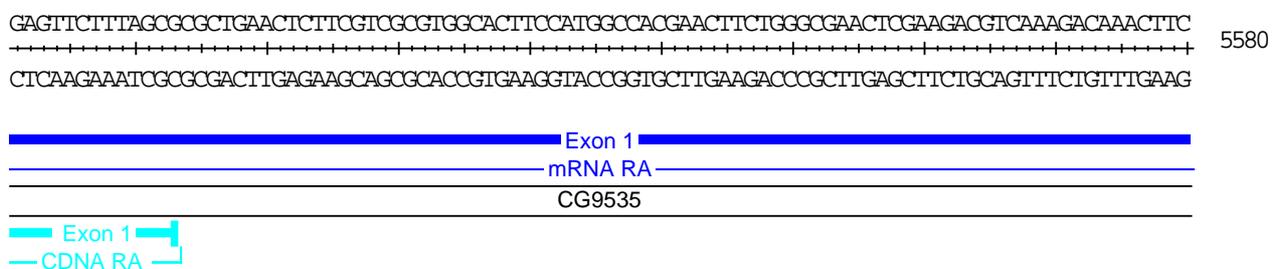
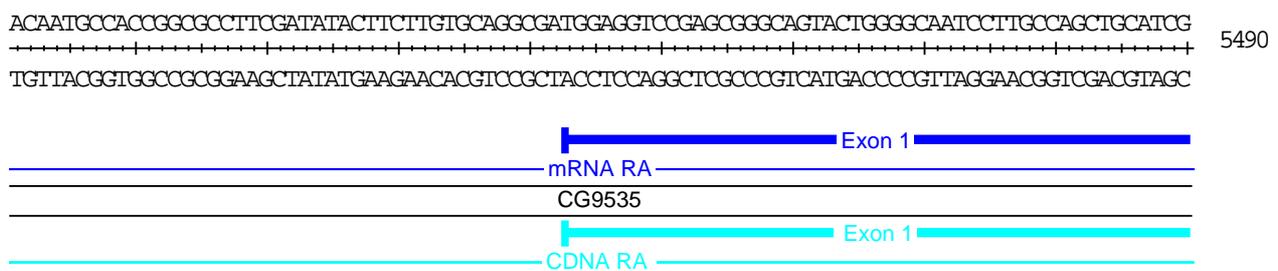
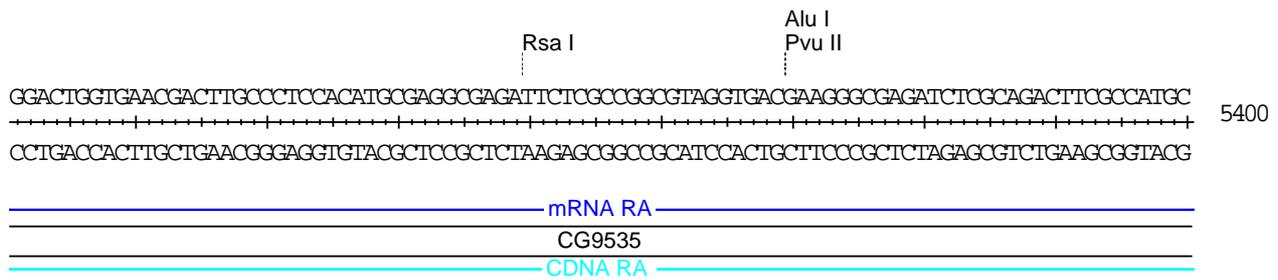
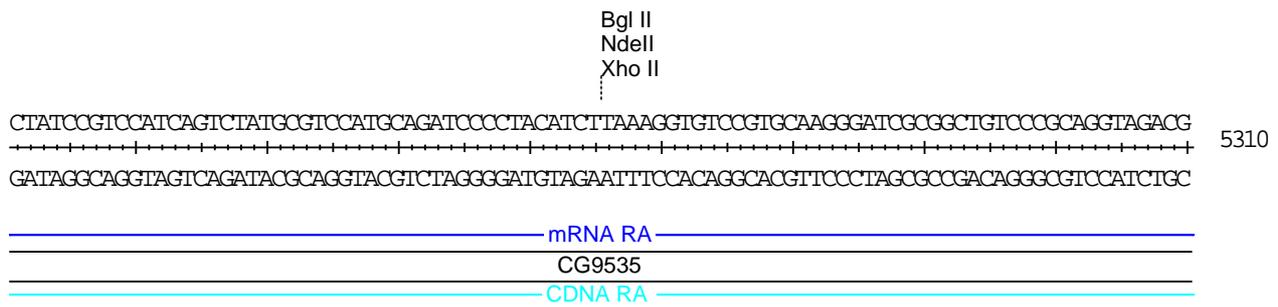
CAATGGAATTTCCGTGCACTAACTACAGTTTGGGGAATCATAAAGTTCATCAACCGTATACGAAAGATTTACAATAATCGAAACGACTA
GTTACCTTAAAGGCACGTGATGTCAAAACCCTTAGTATTTCAAGTAGTTGCCATATGCTTCTTAAATGTTTATTAGCTTTGCTGAT

5220

mRNA RA

CG9535

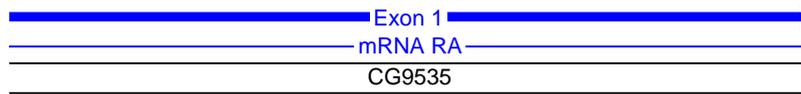
CDNA RA



Bgl II
NdeI
Xho II

TTTGGGGAATCATAAAGTTCATCAACGGTATACGAAAGATTTACAAATAATCGAAACGACTACTATCCGTCCATCAGTCTATGCGTCCAT 5760

AAACCCCTTAGTATTTCAAGTAGTTGCCATATGCTTTCFAAATGTTTATTAGCTTTGCTGATGATAGGCAGGTAGTCAGATACGCAGGTA



Rsa I Alu I
Pvu II

GCAGATCCCCTACATCTTAAAGGTGTCGGTGCAGGGATCGCGGCTGTCCCGCAGGTAGACGGGACTGGTGAACGACTTGCCCTCCACAT 5850

CGTCTAGGGGATGTAGAATTTCCACAGGCACGTTCCCTAGCGCGACAGGGCGTCCATCTGCCCTGACCACCTTGCTGAACGGGAGGTGTA

GCGAGGCGAGATTCTCGCCGGCGTAGGTGACGAAGGGCGAGATCTCGCAGACTTCGCCATGCACAATGCCACCGGCGCCTTCGATATACT 5940

CGCTCCGCTCTAAGAGCGGCGCATCCACTGCTTCCCGCTCTAGAGCGTCTGAAGCGGTACGTGTTACGGTGGCCGCGGAAGCTATATGA

TCTTGTGCAGGCGATGGAGGTCCGAGCGGGCAGTACTGGGGCAATCCTTGCCAGCTGCATCGGAGTTCCTTTAGCGCGCTGAACCTTTCGT 6030

AGAACACGTCCGCTACCTCCAGGCTCGCCCGTCATGACCCCGTTAGGAACGGTCGACGTAGCCTCAAGAAATCGCGGACTTGAGAAGCA

CGCGTGGCAC 6040

GCGCACCGTG

Anhang V: Verwendete Sequenz zur Erstellung des *kette*RNAi. Die Positionen der Primer sind angegeben.

Alu I
Dde I
Dsa I
Sac II

GGATATGGCACGCCCAATTTTCCGAACCAGCAGAAGTAGCTGAGAACTAATCATCTTGAATGACCGCGGCTGGCATTCTTACGGGATATACAA 30
 CCTATACCGTGC GGTTAAAAAGCCTGGTCGCTTCTATCGACTCTTTGATTAGTAGAACTTACTGGCGCGGACCCGTAAGAATGGCCTATATGTT

→ Primer 5'

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

Nsp I
Sph I
Hinf I

CATCAAGAAAGCATGCGGGCAGCACCAAGTCGAAGCCAGGCTCTCTCCGAGAAGTCGTTGGAATCGAGCATCAAGTTTATCGTGAAGCGGTTCCCAAC 4
 GTAGTTCCTTCGTACGCCCTGTGGTTCAGCTTCGGTCCGAAGGAGAGGCTCTTCAGCAACCTTAGTCGTAGTTCAAATAGCATTCCGCCAAGGGTGTG

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

Msi I

ATCGACGTCAAAGGGCTCAATGCCAITGTAACATCAAAAGCGGAGATTATTAAGTCGCTGTCCCTGTATTACCACACATTCGTGGACCTACTTGATTCA 5
 TAGTCGAGTTCCTCCGAGTTACGGTAACATTGTAGTTTCGCCCTCAATAAATCAGCGACAGGGACATAATGGTGTGAAGCACCTGGATGAACATAAAGT

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

Msi I
Hinf I
Alu I
Ssp I

AGGACAATGTATGCGAATGCTCACCACGATGGACGCTGCCAGATTCACCTGGACATCACATTGAACTTCGAGCTGACCAAAATATTATCTGGACTTGGT 6
 TCCTGTTACATACGCTTGACGAGTGGTGCTACCTGCGGACGCTAAGTGGACCTGTAGTGAACCTGAACTCGACTGGTTTATAATAGACCTGAACCA

← 3' Primer Rev. Compl.

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

Drd I

TGTGACCTACGGTCCCTTGATGATTGTTTGGTC 633
 AACTGGATGCACAGGAACCTACTAACAACAAACAG

← 3' Pri

C D L R V L D D C F V
 V T Y V S L M I V L S
 L . P T C P . . L F C
 Q S R R T R S S Q K T
 T V . T D K I I T K D
 H G V H G Q H N N Q R

Anhang VI: Etablierte, transgene UAS *kette* RNAi-Stämme.

Die chromosomale Lokalisation und die jeweiligen Augenfarben sind angegeben. Die letzte Spalte zeigt an, wie stark der Effekt der Borstenphänotypen nach der Expression mit *sca* Gal4 war.

Stamm	Chromosom	Augenfarbe	Effekt, getrieben mit <i>sca</i> Gal4
<i>kette</i> RNAi 1-1	3	orange	***
<i>kette</i> RNAi 1-2	3	orange	***
<i>kette</i> RNAi 2-1	3	orange	n. d.
<i>kette</i> RNAi 2-2	2	rot	**
<i>kette</i> RNAi 2-2	3	rot	***
<i>kette</i> RNAi 3-1	3	orange	***
<i>kette</i> RNAi 3-2	3	orange	***
<i>kette</i> RNAi 4-1	3	hell-orange	**
<i>kette</i> RNAi 4-2	2	orange	n. d.
<i>kette</i> RNAi 5-1	3	orange	*

Die Phänotypen wurden homozygot für Treiber und Effektor beurteilt. * = schwach, ** = mittel, *** = stark, n. d. = nicht bestimmt

Anhang VII: Auszählungsergebnisse der Borsten nach Expression von *kette* RNAi

Genotyp	durchschnittl. Anzahl fehlender Borsten	durchschnittl. Anzahl dünnerer Borsten
<i>sca</i> Gal4/ <i>sca</i> Gal4	2,6	0,5
<i>sca</i> Gal4/ <i>sca</i> Gal4; <i>kette</i> RNAi 1-2	3,3	2,1
<i>sca</i> Gal4/ <i>sca</i> Gal4; <i>kette</i> RNAi 1-2/ <i>kette</i> RNAi 1-2	3,8	1,5

Gezählt wurden die DC-Borsten, PA-Borsten und SC-Borsten
Anzahl der gezählten Tiere: 30

Anhang VIII: Veränderungen der hypomorphen *kette* -Allel-Kombination durch *P* -Elemente und Defizienzen.

Verwendete Defizienzen & P-Elementinsertionen	Blomington-Stammnr.	Chromosom	Lokalisation	Veränderung des hypomorphen <i>kette</i> -Phänotyps
<i>Df(2R)171</i>	4913	2	041F03-04; 042A03-09	nicht verändert
<i>pdid</i>		2	87E8-9	nicht verändert
<i>DF(3R)M-Kx1</i>	3128	3	086C01; 087B01-05	nicht verändert
<i>Df(3L)st-fl3</i>	2993	3	072C01-D01; 073A03-04	nicht verändert
<i>Df(3L)pbl-X1</i>	1420	3	065F03; 066B10	nicht verändert
<i>Sc2</i> ⁰⁵⁶³⁴	11666	3	063F05-06	stärker
<i>p(PZ)Hsc70-4</i> ⁰²⁵⁵⁰	5807	3	88E04	nicht verändert
<i>Df(3R)Tl-1</i>	1911	3	097B;097E	nicht verändert
<i>Df(3L)GN19</i>	416	3	063F04-07; 064B09-11	stärker (nicht alle Tiere)

Anhang IX: Liste des Defizienzenkits (Mai 2002) unter Angabe der Stammbeschreibung, der Deletionsbruchpunkte und der phänotypischen Auswirkungen der Deletionen auf den Phänotyp der *GMR Gal4/kette^{myr}*-Fliegen.

BL-Nr.	Genotyp	Breakpoints	Augeneffekt		Bemerkungen	BL-Nr.
			25°C	29°C		
DK1						
1329	Df(1)BA1, w[*]/FM7; Dp(1;2)E1, yf+/-	1A1;2A	0	eventl.schwächer		1329
1546	Df(1)sc-J4	1B2-14;3A3	/	/		1546
936	Df(1)64c18, g[1] sd[1]/Dp(1;2;Y) w+/-/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]	2E1-2;3C2	0	/		936
935	Df(1)JC19/FM7c	2F6;3C5	/	/		935
729	Df(1)N-8/FM7c	3C2-3;3E3-4	0	0		729
939	Df(1)dm75e19/FM7c	3C11;3E4	nicht geschlüpft	nicht geschlüpft		939
940	Df(1)A113/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;2) w+/- 64b/+	3D6-E1;4F5	/	0		940
944	Df(1)JC70/FM7c, sn[+]	4C15-16;5A1-2	/	/		944
5705	Df(1)BA2-8, w[a]B[1]/FM7c	4F5;5A13	0	0		5705
945	Df(1)C149/FM6	5A8-9;5C5-6	0	0		945
946	Df(1)N73/FM6	5C2;5D5-6	0	0		946
5281	Df(1)dx81, w[*]/Dp(1;Y) dx[+]/C(1)M5	5C3-10;6C3-12	0	eventl.schwächer	keine nekrotischen Bereiche	5281
3196	Df(1)Sxl-bt, y[1]/Binsinscy	6E2;7A6	/	/		3196
948	Df(1)ct-J4/ln(1)d1-49, f[1]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;3) sn [13a1]/Ki[1]	7A2-3;7C1	stärker	0		948
3221	Df(1)ct4b1, y[1]/Binsinscy	7B2-4;7C3-4	etwas stärker	/		3221
949	Df(1)C128/FM6	7D1;7D5-6	stärker	/		949
950	Df(1)RA2/FM7c	7D10;8A4-5	0	/		950
951	Df(1)KA14/FM7c	7F1-2;8C6	0	/		951
3651	Df(1)z-90b24/FM7c	8B5-6;8D8-9	stärker	/		3651
952	Df(1)C52, f[w]C52/FM6	8E;9C-D	0	/		952
954	Df(1)v-L15/FM6	9B1-2;10A1-2	/	/		954
3560	Df(1)v-N48, f[*]/Dp(1;Y) y[+] v[+]/#3/C(1)DX, y[1] f[1]	9F;10C3-5	/	/		3560
957	Df(1)KA7/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;2)v[+]/65b/+	019A09;010F06-07	/	/		957
959	Df(1)HA85/FM7c	10C1-2;11A1-2	/	0		959
962	Df(1)N105/FM6	10F7;11D1	0	0		962
964	Df(1)JA26/FM7c	011A01;011D-E	/	/		964
967	Df(1)C246/FM6	11D-E;12A1-2	/	0		967
966	Df(1)N12, ras[1]y[1]/FM6	011D01-02;011F01-02	0	stärker	klein, glänzend	966
727	Df(1)g, f[1]B[1]/ln(1)AM	12A3-10;12E9	0	/	schlecht zu sehen	727
998	Df(1)RK2/FM7a	12D2-E1;13A2-5	0	0		998
1039	Df(1)RK4/FM7c/Dp(1;Y) y[+], y[1]	12F5-6;13A9-B1	nicht geschlüpft	stärker		1039
3347	Df(1)sd72b/FM7a	13F1;14B1	0	stärker		3347
125	Df(1)4b18, y[1] cv[1]v[1] nonA[4b18]f[1]car[1]/Basc	Df(1)4b18	0	nicht geschlüpft		125
3217	Trp(1;2)r[+]/75cs[3]/CyO; C(1)M4, y[2]	14B13;15A9	/	/		3217
4741	Df(1)B25, Sh[14]/FM6	15D3;16A4-6	0	nicht geschlüpft		4741
4953	Df(1)BK10, r[*] f[1]/Dp(1;Y) W73/C(1)DX	16A2;16C7-10	schwächer	/		4953
6217	Df(1)RR79, w[1118]/FM7a	16C;16F	/	/		6217
970	Df(1)N19/FM6	17A1;18A2	0	0		970
971	Df(1)JA27/FM7c	18A5;18D	stärker	/		971
972	Df(1)HF396/FM7c	18E1-2;20	nicht geschlüpft	/		972
977	Df(1)DCB1-35b/Fm6/Dp(1;Y) y[+]/mal[106], mal[106]	19F1-2;20E-F	0	/		977
3714	Df(1)A209/FM7a	20A;20F	0	0		3714
DK2						
3638	Df(2L)net-PMF/SM6a	021A01;021B07-08	0	/		3638
6283	Df(2L)BSC4, w[+mC], net[1] cn[1]/SM5	021B07-C01;021C02-03	0	/		6283
6608	Df(2L)BSC16, net[1] cn[1]/SM6a	021C03-04;021C06-08	0	0		6608
3084	Df(2L)jast2/SM1	021D01-02;022B02-03			Df macht rauhe Augen	3084
3133	Df(2L)dp-79b, dp[DA] cn[1]/ln(2LR)bw[V1], ds[33k] b[1] bw[V1] ! does not delete dp	022A02-03;022D05-E01	0	/		3133
6648	Df(2L)dpp[d14]/CyO	022E04-F02;022F03-023A01	0	/		6648
90	Df(2L)C144, dpp[d-ho] ed[1]/ln(2LR)Gla, Gla[1] Bc[1] Egfr[E1]	023A01-02;023C03-05	wenig schwächer	schwächer		90
97	Df(2L)JS32, dpp[d-ho]/SM6a	023C03-05;023D01-02	0	/		97
3573	ln(2LR)DTD16[L]DTD42[R], bw[1] sp[1]/CyO != Df(2L)23C;23E3-6	023C;023E03-06	0	/		3573
4954	Df(2L)S2590/CyO, P[sevRas1.V12]FK1	023D02;023E3	0	/		4954
6502	Df(2L)tim-O2/CyO	023F02-03;023F06-024A01	0	/		6502
6507	y[1] w[*]; Df(2L)drn-P2, P[lacW]Pdsw[k10101]/SM6b	023F03-04;024A01-02	0	/		6507
5330	Df(2L)jed1/CyO; P[ftz/lacC]1	024A02;024D04	0	/		5330
693	Df(2L)sc19-8/SM6b; Dp(2;1)B19, y[1], ed[1] dp[o2] cl[1]	024C02-08;025C08-09	schwächer	nicht geschlüpft		693
3813	Df(2L)sc19-4/ln(2L)Cy[L]t[R] ln(2R)Cy, Cy[1] Roi[1] cn[2] sp[2] (or[*]); Dp(2;1)B19, y[1] ac[1] sc[1] pn[1] ed[1] dp[o2] cl[1]	025A05;025E05	stärker?	/		3813
781	Df(2L)cl-h3/SM6b	025D02-04;026B02-05	0	/		781
490	ln(1)w[m4]; Df(2L)E110/CyO	025F03-026A01;026D03-11	0	wenig abgeschwächt		490
6299	Df(2L)BSC5, w[+mC]/SM6a	026B01-02;026D01-02	0	0		6299
6338	Df(2L)BSC6, dp[ov1] cn[1]/SM6a	026D03-E01;026F04-07	0	/		6338
6374	w[1118]; Df(2L)BSC7/CyO	026D10-E01;027C01	0	/		6374

3571	Df(2L)Dwee-delta5/Dp(?;2)bw[D], S[1] wg[Sp-1] Ms(2)M[1] bw[D]/CyO	027A;028A	0	/		3571
1357	Df(2L)J-H/SM5	027C02-09;028B03-04	0	/		1357
3077	Df(2L)spd, all[1] dp[ov1]/CyO	027D-E;028C	0	0		3077
4955	Df(2L)XE-2750/CyO, P{sevRas1.V12}FK1	028B02;028D03	/	0		4955
140	Df(1)w67e23, y[1]; Df(2L)Trf-C6R31/CyO	028DE (within)	0	/		140
179	In(1)w[m4h], y[1]; Df(2L)TE29Aa-11, dp[*]/CyO	028E04-07;029B02-C01	0	/		179
2892	Df(2L)N22-14/CyO	029C01-02;030C08-09	0	0		2892
6478	Df(2R)BSC17/SM6a	030C03-05;030F01	0	0		6478
1045	Df(2L)Mdh, cn[1]/Dp(2;2)Mdh3, cn[1]	030D-30F;031F	0	0		1045
1469	Df(2L)J39/In(2L)Cy; Dp(2;Y)cb50, Dp(1;Y)B[S]Yy[+]/C(1)RM	031C-D;032D-E	0	/		1469
5869	Df(2L)FCK-20, dp[ov1] bw[1]/CyO, P{sevRas1.V12}FK1	032D01;032F01-03	0	nicht geschlüpft		5869
3079	Df(2L)Pri, Prf[1] nub[Prf]/CyO	032F01-03;033F01-02	0	0		3079
3344	Df(2L)prdl.7, b[1] Adh[n2] prf[1] cn[1] sca[1]/CyO, P{elav-lacZ.H}YH2	033B02-03;034A01-02	0	0		3344
3138	Df(2L)b87e25/CyO	034B12-C01;035B10-C01	0	/		3138
3588	Df(2L)TE35BC-24, b[1] prf[1] pk[1] cn[1] sp[1]/CyO	035B04-06;035F01-07	0	/		3588
1491	Df(2L)r10, cn[1]/CyO	035D01;036A06-07	0	/		1491
2583	Df(2L)caet-255rv64, cact[chif64]/CyO; ry[506]	035F-036A;036D		0 (schlecht geschlüpft)		2583
3180	Df(2L)H20, b[1] prf[1] cn[1] sca[1]/CyO	036A08-09;036E01-02	0	/		3180
420	Df(2L)TW137, cn[1] bw[1]/CyO, Dp(2;2)M(2)m[+]	036C02-04;037B09-C01	0	/		420
3189	Df(2L)TW50, cn[1]/CyO, Dp(2;2)M(2)m[+]	036E04-F01;038A06-07	0	/		3189
167	Df(2L)TW161, cn[1] bw[1]/CyO	038A06-B01;040A04-B01	stärker	0		167
4959	Df(2L)C/CyO	040h35;040h38L	0	/		4959
749	In(2R)bw[VDe2L]CyR/In(2LR)Gla, Gla[1]	041A-B;042A02-03	0	0		749
739	Df(2R)M41A4/SM1	041A	0	/		739
1007	Df(2R)nap9/In(2LR)Gla, Dp(2;2)BG, Gla[1]	042A01-02;042E06-F01	0	nicht geschlüpft		1007
1888	Df(2R)ST1, Adh[n5] prf[1] cn[*]/CyO	042B03-05;043E15-18	0	/		1888
3368	Df(2R)cn9/Roi[1] sp[*]	042E;044C	/	/		3368
198	w[118]; Df(2R)H3C1/CyO	043F;044D03-08	0	/		198
201	w[118]; Df(2R)H3E1/CyO	044D01-04;044F12	0	0		201
3591	w[1]; Df(2R)Np5, In(2LR)w45-32n, cn[1]/CyO	044F10;045D09-E01	0	0 (schlecht geschlüpft)		3591
4966	w[1]; Df(2R)w45-30n cn[1]/CyO	045A06-07;045E02-03	0	0		4966
1743	w[1118]; Df(2R)B5, px[1] sp[1]/CyO, Adh[nB]	046A;046C	0	/		1743
1702	Df(2R)X1, Me[2]X1/CyO, Adh[nB]	046C;047A01	0	/		1702
447	Df(2R)stan1, P{neoFRT}42D cn[1] sp[1]/CyO	046D07-09;047F15-16	0	/		447
190	Df(2R)en-A/CyO	047D03;048B02	0	/		190
1145	Df(2R)en30/SM5; Dp(1;Ybb[-])B[S]	048A03-04;048C06-08	0	0		1145
4960	Df(2R)CB21/CyO; ry[506]	048E;049A	0	/		4960
5879	Df(2R)BSC3, w[+mC] unch[k15501] cn[1] bw[1] sp[1]/SM6a, bw[k1]	048E12-F04;049A11-B06	0	/		5879
754	Df(2R)vg-C/SM5	049A04-13;049E07-F01	0	0		754
442	Df(2R)CX1, b[1] prf[1]/SM1	049C01-04;050C23-D02	0	/		442
6455	Df(2R)BSC11/SM6a	050E06-F01;051E02-04	0	/		6455
6516	Df(2R)BSC18/SM6a	050D01;050D02-07	0	/		6516
3518	w[a] N[fa-g]; Df(2R)Jp1/CyO	051D03-08;052F05-09	0	nicht geschlüpft		3518
3520	w[a] N[fa-g]; Df(2R)Jp8, w[+]/CyO	052F05-09;052F10-53A01	stärker	0	Augen flächiger	3520
6404	y[1]; Df(2R)P803-delta15, cn[1]/SM1; sv[spa-pol]	053E;053F11	0	/		6404
5680	Df(2R)robl-c/CyO, y[+]	054B17-C04;054C01-04	/	0		5680
5574	y[1] w[67e23]; Df(2R)k10408, P{lacW}BEST:GM02553[k10408]/CyO	054C01-04;054C01-04 (?)	0	/		5574
3064	Df(2R)Pc17B/CyO	054E08-F01;055B09-C01	stärker	stärker	"Lidschatten"	3064
1547	Df(2R)PC4/CyO	055A;055F	0	/		1547
757	y[*] w[*]/Dp(1;Y)y[+]; Df(2R)P34/CyO	055E02-04;056C01-11	0	/		757
6647	Df(2R)BSC22/SM6a	056D07-E03;056F09-12	0	/		6647
543	Df(2R)017/SM1	056F05;056F015	0	/		543
3467	Df(2R)AA21, c[1] px[1] sp[1]/SM1	056F09-17;057D11-12	0	0		3467
6609	Df(2R)BSC19, cn[1] bw[1]/SM6a	056F12-14;057A04	0	wenig schwächer	nekrotische Bereiche kleiner	6609
5246	Df(2R)Egfr5, b[1] prf[1] cn[1] sca[1]/CyO, P{sevRas1.V12}FK1	057D02-08;058D01	stärker	stärker, Augen verkleinert	Verstärkung bei 25°C deutlicher zu sehen	5246
282	Dp(1;Y)y[+]/y[1]; Df(2R)X58-12/SM5	058D01;059A	0	0		282
3909	w[*]; Df(2R)59AD/SM1	059A01-03;059D01-04	0	/		3909
1682	Df(2R)or-BR6, cn[1] bw[1] sp[1]/In(2LR)lt[G16L]bw[V32gR]	059D05-10;060B03-08	0	0 (Augen dunkler)		1682
750	Df(2R)Px1, all[1] dp[ov1] pwn[1]/SM5	060B08-10;060D01-02	0	nicht geschlüpft		750
2604	Df(2R)Px2/SM5	060C05-06;060D09-10	0	nicht geschlüpft		2604
2471	Df(2R)M60E/In(2LR)bw[V32g], bw[V32g]	060E02-03;060E11-12	0	0	gewellte Borsten (25°C)	2471
3157	Df(2R)ES1, b[1] prf[1] cn[1] wx[wxt] Kr[If-1]/SM1	060E06-08;060F01-02	0	0		3157
4961	Df(2R)Kr10/CyO	060F01;060F05	0	/		4961
DK3						
2577	Df(3L)emc-E12/TM6B, Tb[1]	061A;061D03	0	/		2577
439	Df(3L)Ar14-8, red[1]/TM2, p[p]	061C05-08;062A08	0	/		439
5411	Df(3L)Aprt-32/TM6	062B01;062E03	0	/		5411
2400	Df(3L)R-G7, ve[1]/TM6B, Tb[+]	062B08-09;062F02-05	0	schwächer		2400
3650	Df(3L)M21, kn[ri-1] p[p]/In(3LR)T33[L]f[9]R[1] ! see comment	062F;063D	0	nicht geschlüpft		3650
3649	Df(3L)HR119/TM6B, Tb[1]	063C02;063F07	0	nicht geschlüpft		3649
463	w[1118]; Df(3L)GN34/TM3, ry[*] su(Hw)[2] Sb[1]	063E06-09;064A08-09	0	/		463
3686	Df(3L)GN24/TM8, l(3)DTS4[1]	063F04-07;064C13-15	0	0		3686
3096	Df(3L)ZN47, ry[506]/TM3, Sb[1]	064C;065C	0	/		3096

4393	w[*]; Df(3L)XD198, e1/TM6B, Tb1]	065A02;065E01	0	0		4393
1420	Df(3L)pbl-X1/TM6B, Tb1]	065F03;066B10	0	schwächer, keine nekrotischen Flecken		1420
5877	w[1]; Df(3L)ZP1/TM3, Sb[1] Ser[1]	066A17-20;066C01-05	0	/		5877
1541	y[1] w[1] N[sp1-1]; Df(3L)66C-G28/TM3, Sb[1]	066B08-09;066C09-10	eventl. schwächer	0		1541
6460	Df(3L)BSC13, rho[ve-1] e1/SM6a	066B12-C01;066D02-04	0	0		6460
3024	Df(3L)h-i22, h[22] Kif[1] roe[1] p[p]/TM3, Ser[1]	066D10-11;066E01-02	/	/		3024
4500	Df(3L)Scf-R6, th[1] st[1] cu[1] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, Sb[1]	066E01-06;066F01-06	0	0		4500
1688	Df(3L)Rdl-2, e1/TM3, Sb[1]	066F05;066F05	0	/		1688
2479	Df(3L)29A6, kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]	066F05;067B01	0	/		2479
997	Df(3L)AC1, roe[1] p[p]/TM3, Sb[1]	067A02;067D07-13 or 067A05;067D09-13	0	nicht geschlüpft		997
6471	Df(3L)BSC14, rho[ve-1] p[*] e1/TM3, Ser[1]	067E03-07;068A02-06	0	/		6471
2611	Df(3L)vin5, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068A02-03;069A01-03	0	/		2611
2612	Df(3L)vin7, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068C08-11;069B04-05	0	/		2612
5492	w[*]; Df(3L)eyg[C1]/TM3, P[ftz/lacC]SC1, Sb[1] ry[RK]	069A04-05;069D04-06	0	/		5492
6456	Df(3L)BSC10, rho[ve-1] e1/TM3, Ser[1]	069D04-05;069F05-07	0	0		6456
6457	Df(3L)BSC12, rho[ve-1] e1/TM3, Ser[1]	069F06-07A01;070A01-02	0	/		6457
4366	In(3LR)C190[L]Ubx[42TR], Ubx[-]/stif[1]	069F03-04;070C03-04 + 089;089	/	0		4366
3124	Df(3L)Fz-GF3b, P[wA[R]]66E/TM6B, Tb[1]	070C01-02;070D04-05	0	0		3124
3126	Df(3L)Fz-M21, th[1] st[1]/TM6	070D02-03;071E04-05	0	0		3126
6551	Df(3L)XG-5/TM3, P{Thb8-lacZ}WD1, Sb[1] Ser[1]	071C02-03;072B01-C01	0	/		6551
3640	Df(3L)brm1/TM6C, cu[1] Sb[1] ca[1]	071F01-04;072D01-10	0	nicht geschlüpft		3640
2993	Df(3L)st-f13, Kif[1] roe[1] p[p]/TM6B, Tb[1]	072C01-D01;073A03-04	stärker	nicht geschlüpft		2993
2998	Df(3L)81k19/TM6B, Tb[1]	073A03;074F	0	nicht geschlüpft		2998
6411	Df(3L)BSC8/TM3, Sb[1]	74D03-075A01;075B02-05	0	0		6411
2608	Df(3L)W10, ru[1] h[1] Sb[sbd-2]/TM6B, Tb[1]	075A06-07;075C01-02	0	/		2608
2990	Df(3L)Cat, kni[ri-1] Sb[sbd-1] e[*]/TM3, Ser[1]	075B08;075F01	0	/		2990
3617	Df(3L)kto2/TM6B, Tb[1]	076B01-02;076D05	0	0		3617
5126	Df(3L)XS-533/TM6B, Sb[1] Tb[1] ca[1]	076B04;077B	0	/		5126
2052	Df(3L)rdgC-co2, th[1] st[1] in[1] kni[ri-1] p[p]/TM6C, cu[1] Sb[1] Tb[1] ca[1]	077A01;077D01	stärker	stärker, Augen verkleinert		2052
3127	Df(3L)ri-79c/TM3, Sb[1]	077B-C;077F-78A	0	/		3127
5878	Df(3L)ri-XT1, ru[1] st[1] e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	077E02-04;078A02-04	0	/		5878
4429	Df(3L)ME107, mwh[1] red[1] e[1]/TM1, red[*]	077F03;078C08-09	/	/		4429
4430	Df(3L)Pc-2q, ry[506]/TM2	078C05-06;078E03-079A01	0	nicht geschlüpft		4430
4506	Df(3L)Ten-m-AL29/TM3, ry[RK] Sb[1]	079C01-03;079E03-08	/	/		4506
5951	y[1] w[1]; Df(3L)JHD1/TM6C, Sb[1] Tb[1]	079D03-E01;079F03-06	0	/		5951
6649	Df(3L)BSC21, st[1] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	079E05-F01;080A02-03	/	/	nicht im DK	6649
4370	Df(3L)Delta1AK, ru[1] h[1] ry[506] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	079E05-F01;079F02-06	0	nicht geschlüpft		4370
1518	Df(3R)ME15, mwh[1] red[1] e[4]/MKRS	081F03-06;082F05-07	0	/		1518
4787	Df(3R)3-4, ru[1] th[1] st[1]/TM3, Sb[1]	082F03-04;082F10-11	0	/		4787
5694	w[*]; Df(3R)e1025-14/TM6B, Tb[1]	082F08-10;083A01-03	0	/		5694
1990	Df(3R)Tpi10, Tp(3;3)Dfd[rv1], kni[ri-1] Dfd[rv1] p[p] Doa[10]/TM3, Sb[1]	083C01-02;084B01-02	0	/		1990
2393	Df(3R)WIN1, Kif[1] m[roe-1] p[p]/TM3, Sb[1]	083E01-02;084A04-05	wenig schwächer	0		2393
1884	Df(3R)Scr, p[p] e[s]/TM3, Sb[1]	084A01-02;084B01-02	0	/		1884
1842	Df(3R)Antp17/TM3, Sb[1]	084B01-02;084D11-12 or A06,D14	/	/		1842
1968	Df(3R)jp712, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	084D04-06;085B06	0	nicht geschlüpft		1968
1962	Df(3R)jp-XT103, ru[1] st[1] e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	085A02;085C01-02	verstärkt, glänzend	0		1962
1931	Df(3R)by10, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	085D08-12;085E07-F01	0	/		1931
1893	Df(3R)by62, red[1] e[1]/TM1	085D11-14;085F06	/	/		1893
3128	Df(3R)M-Kx1/TM3, Sb[1] Ser[1]	086C01;087B01-05	0	nicht geschlüpft		3128
3003	Df(3R)T-32, (kni[ri-1] cu[1] sr[1] e[s]/MRS	086E02-04;087C06-07	stärker	/		3003
3007	Df(3R)ry615/TM3, Sb[1] Ser[1]	087B11-13;087E08-11	0	/		3007
1534	Tp(3;Y)ry506-85C/MKRS	087D01-02;088E05-06;Y	0	/		1534
383	Df(3R)ea, kni[ri-1] p[p]/TM3, Ser[1]	088E07-13;089A01	schwächer	schwächer		383
1467	Df(3R)P115, e[11]/TM1; Dp(3;1)P115/+ 1 = Tp(3;1)P115	089B07-08;089E07-08;020	0	/		1467
4431	Df(3R)DG2/TM2	089E01-F04;091B01-B02	0	/		4431
3071	Df(3R)C4, p[*]/Dp(3;3)P5, Sb[1]	089E03-04;090A01-07	0	nicht geschlüpft		3071
3011	Df(3R)Cha7/TM6B, Tb[1]	090F01-F04;091F05	eventl. schwächer	0		3011
3012	Df(3R)DI-BX12, ss[1] e[4] ro[1]/TM6B, Tb[1]	091F01-02;092D03-06	0	/		3012
4962	Df(3R)H-B79, e[*]/TM2	092B03;092F13	0	/		4962
3340	Df(3R)e-R1, Kif[1]/TM3, Sb[1]	093B06-07;093D02	0	0		3340
2425	Df(3R)e-N19/TM2	093B;094	0	/		2425
2586	Df(3R)23D1, ry[506]/TM3, Sb[1] Ser[1]	094A03-04;094D01-04	wenig schwächer	0		2586
4940	cn[1]; Df(3R)mbc-30/TM3	095A05-07;095C10-11	eventl. schwächer	0		4940
2585	cn[1]; Df(3R)mbc-R1, ry[506]/TM3, Sb[1] ry[*]	095A05-07;095D06-11	0	/		2585
4432	Df(3R)erfb-F89-4, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095D07-D11;095F15	0	/		4432
2363	Df(3R)erfb87-5, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095F07;096A17-18	eventl. stärker	0		2363
3468	Df(3R)sls[8]/Dp(3;3)Su[8]	096A02-07;096D02-04	0	/		3468
5601	Df(3R)Esp13/TM6C, Sb[1]	096F01;097B01	stärker	0		5601
1910	Df(3R)TI-P, e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	097A;098A01-02	eventl. schwächer	0		1910
823	Df(3R)D605/TM3, Sb[1] Ser[1]	097E03;098A05	schwächer	/		823
430	w[1]118]; Df(3R)3450/TM6B, Tb[1]	098E03;099A06-08	0	/		430
669	w[*]; Df(3R)Dr-rv1, ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	099A01-02;099B06-11	0	/		669
3547	Df(3R)L127/TM6; Dp(3;1)B152	099B05-06;099E04-F01	0	wenig schwächer		3547
3546	Df(3R)B81, P[RP49]F2-80A e[1]/TM3, Sb[1]; Dp(3;1)67A	099C08;100F05	nicht geschlüpft	0		3546

DK4					
1785	C(4)RM, ci[1] ey[R]	101F01;102F08	0	0	1785
759	Df(4)G/In(4)ci[D], ci[D] pan[ciD] ! see comment	102E02;102E10	0	0	759

0 = kein Effekt, / = Kreuzung nicht angesetzt oder nicht auswertbar

Anhang X : Zusammenstellung der potentiellen Interaktionspartner aus dem Y2H -Assay und den Ergebnissen der Deletionsmutanten-Analyse

CG-Nummer	Merkmal	Chromosom	gen. Region	BI-Nummer	Effekt
4027	Act5C	X	5C5	946	kein Effekt
11759	kinesin-II, non-motor subunit	X	10B8-10B8	957	
10545	Gbeta 13F	X	13F5-13F5	3347	Effekt nicht auf Def. Zurückzuführen?
8893	Gapdh2	X	13F6-13F6	3347	Effekt nicht auf Def. Zurückzuführen?
12533	Homol. zu alpha-actinin	X	18E5-18E5	972	schlüpfen nicht
17941	Dachsous (ds)	2L	21D1-21D1	3084	Star! Effekt nicht zu sehen
11043	cytoC Oxidase	2L	26E3-26E3	6374/6338	0
3430	?	2L	27C7-27C7	3157/3571	0
7111	Rack1, protein kinase C binding	2L	28D1-28D1	4955	0
5787	?	2L	33F3-33F3	3344	0
6180	phosphatidylethanolamine binding	2L	33F3-33F3	3344	0
12051	Act42A	2R	42A4-42A4	1007/739	0 (beide)
12908	nidogen 2 related	2R	47A1-47A1	447	0
3615	homol. zu putativen TM-Proteinen	2R	53A5-53B1	nicht erfaßt im DK	nicht im DK erfaßt
10067	Act57B	2R	57B5-57B5	3467	0
3624	Ig-Protein	2R	58D7-58D7	282	0
11605	filamin-repeat, Filamin	2R	59A3-59A3	3909	0
5562	gbb (glass bottom beats), TGF-beta homolog	2R	60A3-60A4	1682	0
9184	rhodopsintail	3L	61F6-61F6	439	0
16838	ATP/GTPase Homologien	3L	72D9-72D9	2993	stärker (schlüpft nicht auf 29 °C)
13047	?	3L	72D12-72D12	2993	stärker (schlüpft nicht auf 29 °C)
9704 (17489)	NRT, neurotactin	3L	73C3-73C4	2998	0
8727	cyc:cycle,circadianer Rhythmus	3L	76C6-76C6	5126	0
7490	RpP0:structural protein of ribosome	3L	79B2-79B2	nicht im DK erfaßt	nicht im DK erfaßt
2198	ama (amalgam), IG-domain	3R	84A5-84A5	1884	0
6703	caki	3R	93F4-93F6	2425	0
6478	?	3R	97C2-97C2	1910	schwächer (nicht sehr deutlich)
18436	ppn (papilin)	3R	98D3-98D4	nicht im Dk erfaßt	nicht im Dk erfaßt

Anhang XI: Auszählungsergebnisse des Versuchs zur synaptischen Architektur

Genotyp	durchschnittl. Anzahl der Knospen/Bouton
<i>wt</i>	2,75
<i>kette</i> ^{J1-70} / <i>kette</i> ^{Δ2-6}	5,95
<i>elav Gal4/Sra-1 RNAi</i>	5,6
<i>elav Gal4/Sra-1 Δ C</i>	6,4

Anzahl der gezählten Boutons: 60

Anhang XII: Etablierte transgene *dock*^{myr}-Stämme.

Die chromosomale Lokalisation sowie die Augenfarben sind angegeben. Die letzte Spalte zeigt an, wie stark der beobachtete Effekt der jeweiligen Insertion getrieben mit *sca Gal4* war. Die dicker gedruckten Stammbezeichnungen bezeichnen die Stämme, die hauptsächlich für die Versuche verwendet wurden.

Konstrukte	Stamm	Chromosom	Augenfarbe	Stärke des Effektes, getrieben mit <i>sca Gal4</i>
<i>dock</i> ^{myr}	#51-3	X	orange	n.d.
	#51-5	2	orange	n.d.
	#51-6-1	2	dunkel-orange	***
	#51-6-2	3	rot	***
	#51-27	3	rot	***
<i>dock</i> ^{myr} W151K	5	2	rot	*
	2	3	dunkel-orange	****
<i>dock</i> ^{myr} W48K	#82-V-I	X	dunkel-orange	**
	#79-VI-II	3	hellrot	/
	#79-VII-I	3	orange	/
<i>dock</i> ^{myr} W225K	3	2	orange	*
	11	3	rot	***
<i>dock</i> ^{myr} Nt-SH3	1	3	orange	/
<i>dock</i> ^{myr} SH3-middle	1	3	hell-orange	*
<i>dock</i> ^{myr} Ct-SH3	3	3	orange	/
	4	3	rot	/

Die Stämme sind in der Reihenfolge der Chromosomen angegeben. * = schwach, ** = mittel, *** = stark, **** = sehr stark, / = kein Effekt, n. d. = nicht bestimmt.

Anhang XIII : Auszählungsergebnisse der Phänotypen der mechanosensorischen Borsten auf Kopf und Thorax nach Überexpression der membranassoziierten DOCK-Proteinformer

Borstenphänotypen																												
25 °C																												
sca Gal4/sca Gal4 X	Kopf												Kopf		Thorax													
	Stärke des Phänotyps				Beschreibung des Phänotyps								Ocellarborsten		Stärke des Phänotyps				Beschreibung des Phänotyps									
	0	schwach	mittel	stark	gesplittet	kürzer	dicker	dünn	wavy	ektopische Borsten	fehlende Borsten	Flügelphänotyp	Anzahl	ungeordnet	0	schwach	mittel	stark	gesplittet	kürzer	dicker	dünn	wavy	ektopische Borsten	fehlende Borsten	gespaltene Mikrochaeten		
<i>wt^{OregonR}</i>	52%	46%	2%	/	4%	28%	/	16%	/	/	10%	/	7	2%	22%	78%	/	/	2%	12%	/	10%	14%	8%	58%	/		
	98%														100%													
<i>dock^{mt}</i>	/	/	8%	92%	92%	100%	100%	/	/	76%	32%	100%	1	6%	/	/	14%	86%	80%	100%	92%	18%	82%	60%	92%	100%		
	0%														0%													
<i>dock^{mt} W48K</i>	12%	54%	34%	/	64%	86%	26%	/	4%	6%	4%	/	7	10%	6%	60%	28%	6%	62%	84%	44%	10%	78%	10%	42%	/		
	66%														66%													
<i>dock^{mt} W151K</i>	/	/	8%	92%	98%	100%	100%	/	/	56%	40%	100%	5	40%	/	/	/	100%	100%	100%	100%	6%	52%	28%	86%	100%		
	0%														0%													
<i>dock^{mt} W225K</i>	/	2%	16%	82%	98%	100%	100%	6%	4%	24%	18%	100%	6	84%	/	/	30%	70%	80%	96%	84%	46%	70%	28%	72%	100%		
	0%														0%													
<i>dock^{mt} N₁-SH3</i>	78%	22%	/	/	4%	14%	4%	2%	2%	/	2%	/	6	4%	30%	70%	/	/	/	18%	10%	10%	36%	2%	32%	/		
	100%														100%													
<i>dock^{mt} SH3-middle*</i>	49%	39%	3%	10%	15%	33%	3%	5%	/	15%	18%	/	7	3%	10%	69%	3%	18%	3%	39%	/	33%	13%	31%	64%	/		
	88%														79%													
<i>dock^{mt} C₁-SH3</i>	84%	16%	/	/	2%	4%	/	/	/		4%	/	7	4%	22%	78%	/	/	/	/	/	8%	26%	18%	58%	/		
	100%														100%													

* Die Angaben entsprechen aus runderungstechnischen Gründen nicht 100%

Die Angaben in Prozent sind auf die Menge der gezählten Tiere bezogen. Anzahl der gezählten Tiere pro Genotyp : 50

Anhang XIV: Auszählungsergebnisse der Phänotypen der mechanosensorischen Borsten auf Kopf und Thorax nach Überexpression der membranassoziierten DOCK-Proteinformen

Borstenphänotypen																												
25 °C																												
<i>sca Gal4; dock^{myr}</i> X	Kopf												Thorax															
	Stärke des Phänotyps				Beschreibung des Phänotyps								Ocellarborsten		Stärke des Phänotyps				Beschreibung des Phänotyps									
	0	schwach	mittel	stark	gesplittet	kürzer	dicker	dünnere	wavy	ektopische Borsten	fehlende Borsten	Flügelphänotyp	Anzahl	ungeordnet	0	schwach	mittel	stark	gesplittet	kürzer	dicker	dünnere	wavy	ektopische Borsten	fehlende Borsten	gespaltene Mikrochaeten		
<i>wl^{OregonR}</i>	52%	46%	2%	/	4%	28%	/	16%	/	/	10%	/	7	2%	22%	78%	/	/	2%	12%	/	10%	14%	8%	58%	/		
	98%												100%															
<i>dock^{myr}</i>	/	/	8%	92%	92%	100%	100%	/	/	76%	32%	100%	1	6%	/	/	14%	86%	80%	100%	92%	18%	82%	60%	92%	100%		
	0%												0%															
<i>wasp</i>	/	/	6%	97%	100%	100%	100%	/	/	68%	42%	100%	1	4%	/	2%	18%	80%	98%	100%	100%	28%	/	52%	76%	100%		
	0%												2%															
<i>wave</i>	/	/	/	100%	100%	100%	98%	/	/	84%	22%	100%	1	8%	/	2%	16%	82%	98%	100%	98%	12%	4%	30%	96%	100%		
	0%												0%															

Die Angaben in Prozent sind auf die Menge der gezählten Tiere bezogen. Zum Vergleich sind die Angaben von *wl^{OregonR}* und *dock^{myr}* aus Anhang X dargestellt. Anzahl der gezählten Tiere pro Genotyp : 50

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster, der 12. 10. 2005

.....
(Unterschrift)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neurobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Christian Klämbt angefertigt.

Christian möchte ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung und die Fähigkeit danken, jeder guten Nachricht mit Euphorie und jeder schlechten Nachricht mit Gelassenheit zu begegnen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wilfried Janning bedanke ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Priv-Doz. Dr. Klaus Tenberge danke ich für die spontane Einführung in die Rasterelektronenmikroskopie.

Besonderer Dank gilt Dr. Sven Bogdan, der sich immer Zeit für Diskussionen und Gespräche und außerdem dieses Manuskript „unter die Lupe“ genommen hat.

Mein besonderer Dank gilt allen jetzigen und ehemaligen Kollegen, die nicht nur immer ein offenes Ohr hatten (ja, Tobi - auch für die ???), sondern auch für eine gute und fröhliche Stimmung im Labor gesorgt haben.

Jörn und Tobi, den „Kollegen seit der ersten Stunde“ danke ich fürs „Durchhalten und Aufrichten“.

Ein großes Dankeschön geht auch an Steffi, die mir und meinen Fliegen in harten Zeiten mutig zur Seite gestanden hat, an Alex für ihre Geduld mit Blots und an Elke für die „spitze Spritze“ bei den Injektionen.

Jörn und besonders Marc danke ich für die Hilfsbereitschaft am Computer.

Ingrid und Hanna danke ich für viel Gelächter und tröstende Worte.

Ein extra-großes Dankeschön geht an Elke, Robert und Sandra für die wunderbaren Spaziergänge zur Mensa, die Gespräche, Dias und Kekse und dafür, dass sie einfach nicht mehr wegzudenken sind.

Meinen Freunden danke ich für viel Spaß während der Münster-Zeit.

Eve und Jenny danke ich für die Donnerstag-Abende, die kulinarischen Köstlichkeiten und die- auch für Gemecker- offenen Ohren.

Eve und Dine - ich hoffe, das was bleibt!

Meiner Familie gilt mehr Dank, als in diesem Rahmen möglich ist. Dennoch: Meinen Eltern, sowie meiner Schwester Myriel und Lars danke ich besonders dafür, dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe und mir in jeder Beziehung zur Seite gestanden haben.

Moritz danke ich ganz besonders für den unerschütterlichen Glauben an mich, die ständige Unterstützung, den Rückhalt in allen Lebenslagen und die Liebe.

