

Zoologie

**Analyse von Neuron-Glia Interaktionen
im embryonalen Nervensystem von *Drosophila***

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

vorgelegt von
Jan Pielage
aus Bielefeld

-2002-

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. A. Püschel
Tag der mündlichen Prüfung:	11.12.2002
Tag der Promotion:	11.12.2002

1. Einleitung	1
1.1 <i>Drosophila</i> als Modellsystem	1
1.2 Die Entwicklung des zentralen, embryonalen Nervensystems von <i>Drosophila</i>	2
1.2.1 Das Neuroektoderm	2
1.2.1.1 Die Neurogenese innerhalb des Neuroektoderms	3
1.2.2 Das Mesektoderm	4
1.3 Die Entwicklung des embryonalen Axonmusters	5
1.3.1 Die Bildung der Kommissuren	6
1.3.1.1 Die Attraktion zur Mittellinie	8
1.3.1.2 Die Repulsion von der Mittellinie	8
1.3.2 Die Trennung der Kommissuren	11
1.3.2.1 Die Kontrolle der Entwicklung der Mittellinienzellen	11
1.3.2.2 Die Mittellinien-Gliazellen	11
1.3.2.3 Die Mittellinien-Neurone	13
1.3.3 Die Bildung der longitudinalen Konnektive	14
1.3.3.1 Determinierung der Neurone und Gliazellen	14
1.3.3.2 Die Funktion der lateralen Gliazellen	14
1.4 Ziel der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Puffer, Medien, Lösungen	18
2.1.3 Vektoren	22
2.1.4 Bakterienstämme	22
2.1.5 Antikörper	22
2.1.5.1 Primäre Antikörper	22
2.1.5.2 Sekundäre Antikörper	23
2.1.6 Verwendete Fliegenstämme	23
2.1.6.1 Allgemeine Balancer- und Wildtypstämme	23
2.1.6.1 P-Element Insertionen und Enhancer Trap Linien	24
2.1.6.2 Verwendete Mutationen	24
2.1.6.3 GAL4-Treiberlinien	25
2.1.6.4 UAS-Effektorlinien	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Genetische Methoden	26

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1	Fliegenzucht	26
2.2.1.2	Sammeln von Embryonen	26
2.2.1.3	Meiotische Kartierung gegen P-Element-Insertionen	26
2.2.1.4	$\Delta 2$ -3-Reversionsmutagenese	27
2.2.1.5	Bestimmung der Letalitätsphase	28
2.2.1.6	Keimbahntransformation	28
2.2.1.6.1	Präparation der Embryonen	28
2.2.1.6.2	Injektion eines UAS-Konstruktes	28
2.2.1.6.3	Selektion transgener Fliegen	29
2.2.1.6.3	Bestimmung des Insertionsortes	29
2.2.2	Histologische Methoden	29
2.2.2.1	Kutikula-Präparationen	29
2.2.2.2	<i>whole-mount</i> Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	30
2.2.2.3	Präabsorption des anti- β -Galaktosidase Antikörpers	31
2.2.2.4	<i>whole-mount in-situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	31
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.3.1	Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde	33
2.2.3.2	Herstellung elektrokompetenter Zellen	33
2.2.3.3	Bakterientransformation (Elektrotransformation)	34
2.2.3.4	DNA-Restriktionen	34
2.2.3.5	Gelelektrophorese	34
2.2.3.6	Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel	34
2.2.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	35
2.2.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.2.3.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.3.10	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	36
2.2.3.11	Isolierung genomischer DNA aus Fliegen	36
2.2.3.12	Restriktion genomischer DNA für Southern-Blot Analysen	36
2.2.3.13	Southern-Transfer von DNA auf einen Nylonfilter	36
2.2.3.14	Fluorescein-Markierung von DNA-Sonden	36
2.2.3.15	Hybridisierung und Nachweisreaktion (Southern Blot)	37
2.2.3.15	PCR	37
2.2.3.15.1	Standard PCR	37
2.2.3.15.2	Isolierung genomischer DNA aus Einzelfliegen für die PCR	38
2.2.3.15.3	Inverse-PCR	38
2.2.3.15.4	Einzelfliegen Inverse-PCR	39
2.2.3.16	Sequenzierung	39
2.2.4	Biochemische Methoden	40
2.2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	40
2.2.4.2	Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	40
2.2.4.3	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen	40

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.4 Expression von GST-Fusionsproteinen	41
2.2.4.5 Elution von GST-Fusionsproteinen	42
2.2.5 Zellkultur Methoden	42
2.2.5.1 Kultivierung der <i>Drosophila</i> Schneider 2 Zellen	42
2.2.5.2 Bestimmung der Zellzahl	42
2.2.5.3 Antikörperfärbung an <i>Drosophila</i> Schneider S2 Zellen	42
3. Ergebnisse	44
3.1 Darstellung der Neuron-Glia Interaktionen im Wildtyp	44
3.2 Analyse des Gens <i>klötzchen</i>	45
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von <i>klötzchen</i>	45
3.2.1.1 Analyse des fusionierten Kommissurenphänotyps	45
3.2.1.1 Analyse des peripheren Nervensystems und der somatischen Muskulatur	47
3.2.2 Molekulare Charakterisierung von <i>klötzchen</i>	49
3.2.2.1 Meiotische Kartierung der <i>klötzchen</i> Letalität	49
3.2.2.2 Generierung von P-Element induzierten <i>klötzchen</i> Allelen	50
3.2.2.3 Die genomische α -spectrin Region	50
3.2.2.4 Reversion der <i>klötzchen</i> P-Elemente	53
3.2.2.5 Phänotypische Analyse der <i>klötzchen</i> P-Elemente	54
3.2.2.6 Genetischer und phänotypischer Vergleich von <i>klötzchen</i> und α -spectrin	54
3.2.3 Die Funktion von <i>klötzchen</i> und α -spectrin	56
3.2.3.1 Der Aufbau des Spectrin Zytoskeletts	56
3.2.3.2 <i>klötzchen</i> beeinflusst die α -Spectrin Proteinmenge	57
3.2.3.3 α -Spectrin wird in der ventralen Mittellinie exprimiert	57
3.2.3.4 Die mRNA Expression von α -spectrin und <i>CG32315</i>	58
3.2.3.5 Postembryonale Funktionen von <i>klötzchen</i>	59
3.2.3.5.1 <i>klötzchen</i> wird für die Entwicklung des Auges benötigt	60
3.2.3.5.2 <i>klötzchen</i> wird für die Entwicklung weiterer adulter Gewebe benötigt	61
3.2.3.6 <i>klötzchen</i> betrifft die Expression der α -spectrin mRNA	62
3.2.4 Analyse des Gens <i>CG32315</i>	63
3.2.4.1 Rettung des <i>klötzchen</i> Phänotyps durch <i>CG32315</i>	63
3.2.4.2 Sequenzanalyse der <i>klötzchen</i> Mutationen	65
3.2.4.3 Analyse der Aminosäuresequenz des <i>CG32315</i> Proteins	65
3.2.4.4 Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen <i>CG32315</i>	66
3.2.5 Analyse von <i>CG32315</i> und α -spectrin durch <i>RNA-interference</i>	68
3.3 Analyse des Gens <i>kästchen</i>	71
3.3.1 Molekulare Charakterisierung von <i>kästchen</i>	71
3.3.1.1 <i>kästchen</i> entspricht nicht <i>GST-I</i>	72
3.3.1.2 Generierung von P-Element induzierten <i>kästchen</i> Allelen	72

Inhaltsverzeichnis

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung von <i>kästchen</i>	74
3.3.2.1 Analyse des fusionierten Kommissurenphänotyps	74
3.3.2.1 <i>kästchen</i> betrifft die Entwicklung des peripheren Nervensystems	75
3.3.2.2 <i>kästchen</i> kontrolliert Muskel- und Motoneuronentwicklung	76
3.3.2.2 <i>kästchen</i> hat eine Funktion bei der Keimzellmigration	78
3.3.3 Analyse des Expressionsmusters von <i>CG6817</i>	79
3.3.3.1 Analyse der mRNA-Expression	79
3.3.3.2 Analyse des Expressionsmusters der Enhancer Trap Insertion <i>kas^{l(3)j8E8}</i>	80
3.3.4 Postembryonale Funktionen von <i>kästchen</i>	81
3.3.4.1 <i>kästchen</i> wird für die Entwicklung der Photorezeptoren benötigt	81
3.3.4.2 <i>kästchen</i> kontrolliert die Migration der Gliazellen	82
3.3.4.3 <i>kästchen</i> ist an der Augen- und Kopfentwicklung beteiligt	83
3.3.4.4 <i>kästchen</i> ist an der Flügel- und Kopfentwicklung beteiligt	84
3.3.5 Analyse der maternalen <i>kästchen</i> Komponente	84
3.3.6 <i>kästchen</i> interagiert mit <i>hedgehog</i>	86
3.3.7 Entspricht <i>kästchen</i> dem Gen <i>CG6817</i> ?	87
3.3.7.1 Sequenzanalyse der <i>kästchen</i> Allele	87
3.3.7.2 Rettung des <i>kästchen</i> Phänotyps	88
3.3.8 Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen Kästchen/ <i>CG6817</i>	89
3.3.8 Kästchen ist ein evolutionär konserviertes Protein	89
3.4 Analyse des Gens <i>schmalspur</i>	90
3.4.1 Molekulare Charakterisierung von <i>schmalspur</i>	91
3.4.1.1 Meiotische Kartierung der <i>schmalspur</i> Letalität	91
3.4.1.2 Generierung von P-Element induzierten <i>schmalspur</i> Allelen	91
3.4.1.3 Erzeugung von <i>schmalspur</i> „jump out“ Allelen	92
3.4.1.3 Identifizierung der <i>schmalspur</i> cDNA	93
3.4.2 Phänotypische Charakterisierung von <i>schmalspur</i>	96
3.4.2.1 Analyse des fusionierten Kommissurenphänotyps	96
3.4.2.2 Analyse der Funktion von <i>schmalspur</i> für die Muskulatur und Motoneurone	99
3.4.3 Analyse der mRNA-Expression von <i>schmalspur/CG13928</i>	100
3.4.4 Analyse der postembryonalen Funktionen von <i>schmalspur</i>	101
3.4.5 Analyse des <i>Schmalspur/CG13928</i> Proteins	102
3.4.6 Funktionelle Analyse von <i>schmalspur/CG13928</i>	103
3.4.6.1 Auswirkungen der ektopischen Expression von <i>schmalspur/CG13928</i>	103
3.4.6.2 Reversion des <i>schmalspur</i> Phänotyps	105

4. Diskussion	106
4.1 Analyse der Mittelliniengliazellen im Wildtyp	106
4.2 Analyse der Mutationen <i>klötzchen</i>, <i>kästchen</i> und <i>schmalspur</i>	107
4.2.1 Analyse des Gens <i>klötzchen</i>	107
4.2.1.1 Die molekulare Charakterisierung von <i>klötzchen</i>	108
4.2.1.2 Die Funktion des Spectrin Zytoskeletts für die Entwicklung von <i>Drosophila</i>	111
4.2.1.2.1 Die Funktion der Spectrine während der Embryonalentwicklung	112
4.2.1.2.2 Die Entstehung des Phänotyps der Mittellinien-Gliazellen	113
4.2.1.2.3 Die Funktion von α -spectrin/CG32315 bei der Augenentwicklung	114
4.2.1.2.4 Die Funktion des Spectrin Zytoskeletts bei der Oogenese	115
4.2.1.3 Die genomische Organisation der <i>klötzchen</i> Region	117
4.2.1.4 Kodiert <i>klötzchen</i> /CG32315 einen Stabilisator der α -spectrin mRNA?	117
4.2.1.5 Ausblick	118
4.2.2 Analyse des Gens <i>kästchen</i>	119
4.2.2.1 Molekulare Charakterisierung von <i>kästchen</i>	119
4.2.2.2 Die Funktion von <i>kästchen</i>	120
4.2.2.2.1 An welchem Signaltransduktionsweg ist <i>kästchen</i> beteiligt?	121
4.2.2.2.2 <i>kästchen</i> und <i>hedgehog</i> kontrollieren die Migration von Gliazellen	121
4.2.2.2.3 Die Funktion von <i>kästchen</i> bei der Kopfentwicklung	123
4.2.2.2.4 Die Funktion von <i>kästchen</i> im ZNS	123
4.2.2.2.5 Die Funktion von <i>kästchen</i> bei der Keimzellmigration	125
4.2.2.3 Das Kästchen Protein	126
4.2.2.4 Ausblick	128
4.2.3 Analyse des Gens <i>schmalspur</i>	128
4.2.3.1 Die molekulare Charakterisierung von <i>schmalspur</i>	128
4.2.3.2 Die Funktion von <i>schmalspur</i> im zentralen Nervensystem	130
4.2.3.3 Die Funktion von <i>schmalspur</i> bei der Augenentwicklung	131
4.2.3.4 Das Schmalspur Protein	132
4.2.3.5 Die Auswirkungen der ektopischen Expression von <i>schmalspur</i>	133
4.2.3.6 Ist <i>schmalspur</i> ein transkriptioneller Repressor?	133
4.2.3.7 Ausblick	134
5. Zusammenfassung	135
6. Literatur	136
7. Anhang	153

1. Einleitung

Das Nervensystem ermöglicht höheren, multizellulären Organismen eine spezifische Reaktion auf interne und externe Reize. Die Entwicklung eines funktionsfähigen Nervensystems erfordert die korrekte Spezifizierung, die präzise Organisation und Interaktion einer großen Anzahl neuraler Zelltypen. Die Zellen lassen sich hauptsächlich in zwei Kategorien einordnen: Neurone und Gliazellen. Das Verhältnis zwischen Gliazellen zu Neuronen erhöht sich proportional zum Entwicklungsgrad der Organismen. Allein dieser Faktor deutet auf eine immer wichtigere Rolle der Gliazellen für die Entwicklung des Nervensystems hin. Gliazellen wurden schon Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt. Die Bezeichnung der Zellen erfolgte nach dem griechischen Wort für „Kitt“, da die Funktion der Zellen im Zusammenhalten des Nervensystems gesehen wurde (Virchow, 1846).

Während lange Zeit hauptsächlich die Rolle von Neuronen, ihre Entstehung, Wanderung und das Wachstum der Axone untersucht wurde, zeigen neuere Studien die große Bedeutung von Gliazellen für die Entwicklung des Nervensystems. So sind die Gliazellen an der axonalen Wegfindung (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996), der Regulation der Synaptogenese (Nägler et al, 2001; Mauch et al., 2001; Ullian et al., 2001), der Isolierung der Axone gegen die Umgebung, der Homeostasis der Neurone und der Strukturgebung des Nervensystems beteiligt (Lemke, 2001). Besonders wichtig für all diese Prozesse ist die direkte Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen. Nervensysteme sollten somit nicht als ein Netzwerk neuraler Kontakte sondern als ein integriertes Netzwerk interaktiver Neurone und Gliazellen betrachtet werden (Barres and Barde, 2000; Bezzi and Volterra, 2001).

1.1 *Drosophila* als Modellsystem

Zur Analyse der Moleküle und Mechanismen, die an der Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen beteiligt sind, eignet sich insbesondere das embryonale Nervensystem von *Drosophila melanogaster*. Zusätzlich zu den experimentellen und genetischen Möglichkeiten gibt es eine ausführliche Beschreibung der Zellstammbäume, Anordnungen und Identitäten der Neurone und Gliazellen (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1999). Die axonalen Projektionen und Interaktionen zwischen den Zellen sind sowohl für das zentrale als auch das periphere Nervensystem im Detail bekannt. Neurone und Gliazellen sind in einem stereotypischen Muster angeordnet, das sich in jedem Segment wiederholt. Die Zellen lassen sich anhand ihrer Position und der Expression molekularer Marker leicht identifizieren (Goodman and Doe, 1993) und können durch

Einleitung

verschiedene, molekulargenetische Methoden einfach manipuliert werden. So ermöglicht das UAS/GAL4-System die ektopische Expression von Genen in einem definierten temporalen und zelltypspezifischen Muster (Brand and Perrimon, 1993). Genfunktionen lassen sich nicht nur durch das Ausschalten von Genen durch Mutagene wie EMS und Röntgenstrahlen analysieren, sondern auch durch „forward genetics“ Ansätze wie die gezielte homologe Rekombination (Rong and Golic, 2000) und die *RNA interference*-Methode (Kennerdell and Carthew, 1998).

Die Bestimmung der DNA-Sequenz des *Drosophila* Genoms hat die Identifizierung von EMS-induzierten Mutationen deutlich vereinfacht (Adams et al., 2000). Die Analyse der Genome von Mensch und *Drosophila* hat gezeigt, dass ein Großteil der menschlichen Gene, die z. B. mit Krankheiten assoziiert werden, konserviert ist (Rubin et al., 2000; Reiter et al., 2001). Die Identifizierung und Charakterisierung von Mutationen und Signalwegen, die die Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila* beeinflussen, kann somit generelle Erkenntnisse über einen Signalweg und seine Funktion beim Menschen liefern.

1.2 Die Entwicklung des zentralen, embryonalen Nervensystems von *Drosophila*

Die komplexe, dreidimensionale Struktur des zentralen Nervensystems (ZNS) entwickelt sich aus einem zweidimensionalen homogenen Epithel, dem Neuroektoderm. Im *Drosophila* Embryo ist das Neuroektoderm vom Mesoderm durch eine einzelne Reihe mesektodermaler Zellen getrennt; beide Bereiche erhalten neuronale Kompetenz. Die mesektodermalen Zellen bilden später die Neurone und Gliazellen der ZNS-Mittellinie, die die beiden Hälften des bilateralen, segmentalen Nervensystems voneinander trennt.

1.2.1 Das Neuroektoderm

Obgleich beide Gewebe neuronale Kompetenz erhalten, unterscheiden sich die Gewebe hinsichtlich ihrer Spezifizierung. Die Gewebe entlang der dorso-ventralen Achse werden durch einen Gradient kernständigen Dorsal Proteins spezifiziert. Dieser Gradient führt zu einer Einteilung des Embryos entlang der dorso-ventralen Achse in drei Hauptterritorien (Rusch and Levine, 1996; Bier, 1997).

Ventral führt eine hohe Konzentration an Dorsal zur Aktivierung der Mesoderm-Determinanten *twist* und *snail* (Jiang et al., 1991; Pan et al., 1991; Thisse et al., 1991; Ip et al., 1992b). Im ventro-lateral gelegenen präsumtiven Neuroektoderm kommt es zu einer Expression von *rhomboid* (*rho*) (Bier et al., 1990), *short gastrulation* (Francois et al., 1994)

Einleitung

und *lethal of scute (l'sc)*, einem proneuralen Gen des *achaete/scute* Komplexes (Martin-Bermudo et al., 1995). Besonders die Expression von *rho* ist direkt abhängig von Dorsal (Ip et al., 1992a). Im dorsalen Bereich des Embryos führt die Abwesenheit kernständigen Dorsal-Proteins zur Expression von *decapentaplegic (dpp)* und *zerknüllt (zen)* (Ip et al., 1991; Huang et al., 1993). Dpp, ein diffusibles TGF- β Protein, reprimiert in den dorsalen Regionen die Expression von Genen, die für die neuronale Differenzierung wie z. B. *l'sc* zuständig sind.

1.2.1.1 Die Neurogenese innerhalb des Neuroektoderms

Nach der Gastrulation delaminieren die Neuroblasten (NB) in 5 aufeinanderfolgenden Wellen (SI bis SV) vom Neuroektoderm ins Innere des Embryos. Es kommt zur Bildung von ca. 30 Neuroblasten pro Hemisegment, die in einem stereotypen Muster angeordnet sind (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Schmid et al., 1999). Innerhalb des Hemisegments kommt es zu einer Determinierung der Neuroblasten entsprechend ihrer Position entlang der anterior-posterioren und dorso-ventralen Achse. Die einzelnen Neuroblasten sind somit anhand ihrer Position und der Expression verschiedener molekularer Marker spezifisch erkennbar (Bezeichnung von anterior-ventral NB 1-1 bis posterior-dorsal NB 7-4).

Die Spezifizierung der Neuroblasten entlang der anterior-posterioren Achse erfolgt durch die Segmentierungsgene (Paarregel-Gene und Segmentpolaritäts-Gene) wie z. B. *even-skipped* und *fushi-tarazu* (als Paarregel-Gene) und *wingless* und *hedgehog* (als Segmentpolaritäts-Gene), die die Expression der proneuralen Gene *achaete* und *scute* regulieren (Nusslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Skeath and Carroll, 1994).

Entlang der dorso-ventralen Achse wird das Neuroektoderm in drei longitudinale Kompartimente unterteilt. Von ventral nach dorsal definieren die drei Homeobox-Transkriptionsfaktoren *ventral nerve cord defective (vnd)* (Chu et al., 1998; McDonald et al., 1998), *intermediate nerve cord defective (ind)* (Weiss et al., 1998) und *muscle segment homeobox (msh)* (Isshiki et al., 1997) die Identität der einzelnen Neuroblasten. Neben diesen drei Genen sind noch der *Drosophila* EGF-Rezeptor *DER* (van Ohlen and Doe, 2000) und die Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie *SoxNeuro* und *Dichaete* (Buescher et al., 2002; Overton et al., 2002) an der Partitionierung des Neuroektoderms beteiligt.

Aus den unterschiedlichen Neuroblasten entstehen entweder ausschließlich Neurone (Neuroblast, NB), Neurone und Gliazellen (Neuro-Glioblast, NGB) oder ausschließlich Gliazellen (Glioblast, GB). Alle Neuroblasten können entsprechend ihrer Nachkommenschaft einer dieser drei Kategorien zugeordnet werden (Bossing and Technau, 1994; Bossing et al.,

Einleitung

1996; Schmidt et al., 1997; Schmid et al., 1999). Aus den Neuroblasten entstehen insgesamt ungefähr 30 Gliazellen und 350 Neurone pro Hemisegment.

1.2.2 Das Mesektoderm

Im Blastoderm sind die Vorläufer der ZNS-Mittellinienzellen, die mesektodermalen Zellen, in zwei bilateral symmetrischen Zellreihen entlang der anterior-posterioren Achse angeordnet (Thomas et al., 1988). Die Mittellinienvorläuferzellen sind durch ihre Lage zwischen dem präsumtiven Mesoderm und dem lateralen Neuroektoderm, sowie durch die Expression des bHLH-PAS Transkriptionsfaktors *single-minded (sim)*, der als Masterregulator der Mittellinienentwicklung fungiert, spezifisch charakterisiert (Crews et al., 1988; Nambu et al., 1990, 1991). Die Expression von *single-minded* wird durch die Gene *snail*, *twist*, *dorsal* und *Notch* kontrolliert. Snail reprimiert die Expression von *sim* innerhalb des Mesoderms, während Dorsal und Twist für eine Aktivierung von *sim* sorgen. Zugleich ist die Aufhebung der Repression der *sim* Expression durch Supressor-of-Hairless über eine Aktivierung des Notch-Signalweges in dieser Zellreihe für die korrekte Entwicklung notwendig (Menne und Klämbt, 1994; Morel and Schweisguth, 2000).

Am Ende der Gastrulation werden die Mittellinienvorläuferzellen durch die Invagination des Mesoderms an der ventralen Mittellinie zusammengebracht und bilden eine durchgehende Zellreihe von 7-8 Zellen pro Segment (Klämbt et al., 1991; Bossing and Technau, 1994). Die Zellen, die eine eigene mitotische Domäne darstellen (Foe, 1989), delaminieren in die gleiche Ebene wie die Neuroblasten des Neuroektoderms.

Die Mittellinienzellen werden ähnlich wie die Neuroblasten des Neuroektoderms entlang der anterior-posterioren Achse durch die Segmentierungsgene spezifiziert (Hummel et al., 1999a). Die Mittellinien-Gliazellen (ML-Gliazellen) befinden sich im anterioren Bereich und die verschiedenen Mittellinien-Neurone (ML-Neurone) im posterioren Bereich jeden Segmentes (Klämbt et al., 1991). Der Verlust von *hedgehog* führt, analog zur Situation im Ektoderm, zu einem Verlust des posterioren Schicksals, so dass die Anzahl der ML-Gliazellen auf Kosten der ML-Neurone erhöht ist. Der reziproke Phänotyp kommt bei einem Verlust des negativen Regulators des Hedgehog-Signaltransduktionsweges *patched* zustande. Da der Verlust von *wingless* zwar, ähnlich wie der Verlust von *patched*, zu einer Erhöhung der Anzahl der ML-Neurone, nicht aber zu einem gleichzeitigen Verlust von ML-Gliazellen führt, scheinen weitere Mechanismen für die Spezifizierung der Mittellinienzellen verantwortlich zu sein (Hummel et al., 1999a).

Einleitung

Die anterioren Mittellinienvorläuferzellen differenzieren zu drei Paaren Mittellinien-Gliazellen (MGP, MGA, MGM) (Jacobs & Goodman, 1989; Klämbt et al., 1991). Die posterioren Vorläuferzellen differenzieren zu den verschiedenen Neuronen der Mittellinie, den MPI-, DUM-, und VUM-Neuronen sowie zu den Nachkommen des medianen Neuroblasten (MNB). Die Gruppe der VUM-Neurone setzt sich aus Moto- und Interneuronen zusammen, deren Axone innerhalb der anterioren und posterioren Kommissur projizieren (Bossing & Technau, 1994). Die MPI-Neurone sind ipsilateral projizierende Interneurone, die an der Bildung der ersten longitudinalen Faszikel beteiligt sind (Lin et al., 1995; Hidalgo and Brand, 1997).

Am Ende der Embryogenese sind ca. 26 Mittellinienzellen pro Segment vorhanden, die sich aufgrund ihrer Position, Morphologie und der Expression molekularer Marker spezifisch ansprechen lassen (Goodman and Doe, 1993).

1.3 Die Entwicklung des embryonalen Axonmusters

Das embryonale, zentrale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* setzt sich aus zwei Hauptaxonbahnen zusammen, die in einem strickleiterähnlichen Muster angeordnet sind (Abb. I D). Die drei thorakalen und 8 abdominalen Neuomere (Segmente) sind entlang der anterior-posterioren Achse durch ein Paar longitudinaler Konnektive verbunden. Innerhalb eines Neuomers kreuzen die kontralateral projizierenden Axone die ventrale Mittellinie in der anterioren bzw. posterioren Kommissur und verbinden so die beiden Konnektive. Die Bildung der verschiedenen axonalen Trakte erfolgt in einer sequentiellen Abfolge (Abb. I A-D, Klämbt et al., 1991; Hummel et al., 1999a).

Die Entwicklung der Kommissuren beginnt im Stadium 12 mit Anlage der posterioren Kommissur. Die Axone der posterioren Kommissur wachsen in Richtung der VUM-Neurone; zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Mittellinien-Gliazellen (ML-Gliazellen) anterior der Kommissur. Nach der Bildung der posterioren Kommissur wird die anteriore Kommissur in direkter Nachbarschaft angelegt (Abb. I A, C). Es kommt zu zweierlei Zellbewegungen. Die RP1 Motoneurone bewegen sich medial weg von der Mittellinie (graue Zellen, Abb. I A Mitte, Pfeil in C) und gleichzeitig beginnen die ML-Gliazellen nach posterior zu wandern. Die Kommissuren werden durch eine interkalierende Migration der ML-Gliazellen zwischen die anteriore und posteriore Kommissur getrennt. Bei diesem Schritt kommt es zu einer direkten Interaktion zwischen den ML-Gliazellen und den axonalen Fortsätzen der ML-

Einleitung

Neurone (Abb. I D, Pfeile), die als Substrat für die gliale Migration dienen (Klämbt et al., 1991; Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b).

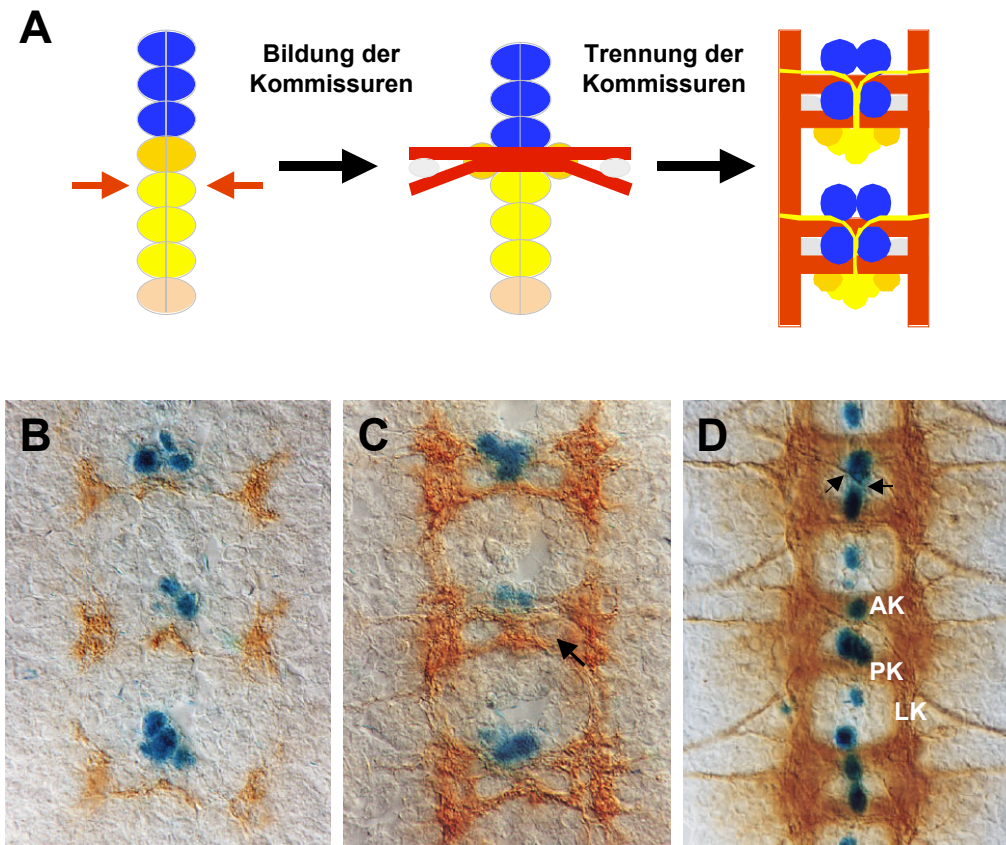


Abb. I Die Entwicklung des embryonalen ZNS. (A) Schematische Darstellung. Die ML-Gliazellen sind in blau dargestellt, die ML-Neurone in gelb. (B-D) Aufsicht auf das ZNS, die ML-Gliazellen sind durch die Enhancer Trap Insertion *AA142* markiert (blau) und die Axone durch den mAb BP102 (braun). Abbildung modifiziert nach Hummel et al., 1999a.

1.3.1 Die Bildung der Kommissuren

In bilateralen Organismen werden die beiden Seiten des Nervensystems über kontralateral projizierende Axone miteinander verbunden. Der Hauptteil der Interneurone sendet Axone über die Mittellinie durch die anteriore bzw. posteriore Kommissur. Während der Entwicklung müssen diese Axone in der richtigen Kommissur zur Mittellinie hin und über die Mittellinie hinweg geleitet werden. Anschließend dürfen sie die Mittellinie nicht noch einmal kreuzen, sondern müssen jetzt den longitudinalen Axonwegen folgen, die sie zuvor auf der anderen Seite der Mittellinie ignoriert haben. Andererseits dürfen ipsilateral-projizierende Neurone zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung die Mittellinie kreuzen.

Einleitung

Der Wachstumskegel eines Axons muss eine Vielzahl von Signalmolekülen integrieren, die er über verschiedene Rezeptormoleküle detektiert. Diese Signale können über große Distanzen als diffusible Moleküle wirken oder lokal als zellgebundene Signale (Tessier-Lavingne and Goodman, 1996). Die Signale, die über spezifische Rezeptoren der Zellmembran weitergeleitet werden, beeinflussen die Organisation und das Verhalten des Zytoskeletts des Wachstumskegel (Mueller, 1999; Song and Poo, 2001). Die Signale fördern (attraktive Signale) oder verhindern (repulsive Signale) die Extension des Wachstumskegels durch das Erleichtern bzw. Erschweren der Bildung von Filopodien (Mueller, 1999).

Die Mittellinie des Nervensystems stellt ein intermediäres Ziel für die kontralateral projizierenden Axone dar. Sobald die Mittellinie erreicht ist, muss die Attraktion zu diesem Ziel verloren gehen und die gleichen repulsiven Mechanismen greifen, die auch die Annäherung der ipsilateralen Axone zur Mittellinie verhindern. Die Moleküle und Mechanismen, die das Axonwachstum zur und über die Mittellinie kontrollieren, sind evolutionär konserviert (Abb. II; Kaprielian et al., 2001; Lemke, 2001; Yu and Bargmann, 2001).

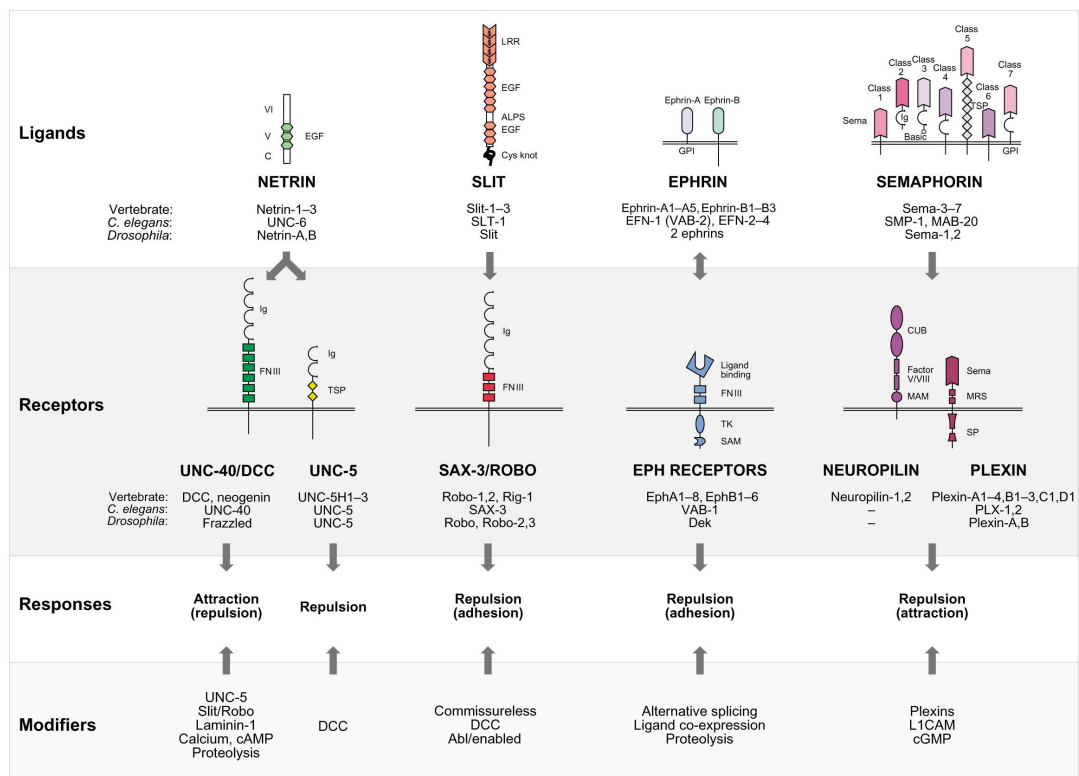


Abb. II Übersicht der wesentlichen Signale und Rezeptoren, die an der Kontrolle des gerichteten axonalen Wachstums beteiligt sind. Die 4 wichtigsten Signal-Rezeptor Familien unter Angabe ihrer Funktion und evolutionären Homologe sind dargestellt (entnommen aus Yu and Bargmann, 2001).

1.3.1.1 Die Attraktion zur Mittellinie

Die Attraktion der kommissuralen Axone, zu denen etwa 90% aller Axone innerhalb des ZNS gehören, zur Mittellinie wird über die Netrine und ihre Rezeptoren vermittelt. Die Mittellinienzellen exprimieren als attraktives Signal die beiden *Drosophila* Netrine, Netrin-A und Netrin-B (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). Das Netrin Signal wird weitergeleitet durch den Netrin-Rezeptor Frazzled, der sowohl von kommissuralen als auch von longitudinalen Axonen exprimiert wird (Kolodziej et al., 1996). An der Attraktion der Wachstumskegel zur Mittellinie sind wahrscheinlich noch zwei weitere Gene beteiligt, *schizo* und *weniger* (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Die Analyse von Doppelmutationen von *frazzled* mit *schizo* bzw. *weniger* zeigte, dass diese beiden Gene wahrscheinlich an einem parallelen attraktiven Signalweg beteiligt sind (Hummel et al., 1999b).

Ablationen der ML-Gliazellen und die Analyse von Mutationen, die zu einem Verlust von ML-Neuronen führen (*orthodenticle*, *hedgehog*) legen nahe, dass hauptsächlich die Expression der Netrine in den ML-Neuronen für die Attraktion der kommissuralen Axone verantwortlich ist (Zhou et al., 1995; Finkelstein et al., 1990; Hummel et al., 1999a). Zugleich kommt es aber auch zu einer Netrin Expression in den ML-Gliazellen von Stadium 12 an (Mitchell et al., 1996). Interessanterweise wird das Netrin-Signal der Mittellinienzellen nicht nur von dem Rezeptor Frazzled erkannt und entsprechende attraktive Signale an den Wachstumskegel weitergeleitet; Frazzled bindet und rearrangiert Netrin, um es so anderen Wachstumskegeln präsentieren zu können, die nicht in direktem Kontakt mit Mittellinienzellen stehen (Hiramoto et al., 2000).

Die Faktoren, die unterhalb des Netrin-Rezeptors Frazzled für die Weiterleitung des attraktiven Signals verantwortlich sind, wurden in *Drosophila* bislang noch nicht identifiziert. Für den humanen Netrin-1 Rezeptor DCC konnte gezeigt werden, dass es nach der Bindung von Netrin-1 zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges kommt, der dann für ein gerichtetes axonales Wachstum verantwortlich ist (Forcet et al., 2002).

1.3.1.2 Die Repulsion von der Mittellinie

Parallel zum attraktiven existiert ein repulsives Signalsystem, das sowohl die Projektion der ipsilateralen Axone zur Mittellinie verhindert, als auch das Wachstum der kontralateralen Axone über die Mittellinie kontrolliert. Slit, das repulsive Signal, ist ein großes extrazelluläres Matrixprotein, das von den ML-Gliazellen sezerniert wird. Der Verlust

Einleitung

von *slit* führt zu einem Kollaps des ZNS an der ventralen Mittellinie (Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990). Slit ist der Ligand für die Roundabout (Robo) Rezeptoren, die ebenso wie Slit evolutionär konserviert sind (Kidd et al., 1999; Brose et al., 1999).

Die Neurone des ZNS exprimieren verschiedene Kombinationen der drei *Drosophila* Robo-Rezeptoren. Die einzelnen Robo-Rezeptoren vermitteln eine unterschiedlich starke Repulsion als Antwort auf den Slit Liganden. In den Einzelmutationen kommt es nicht zu einem vollständigen Kollaps des ZNS an der Mittellinie, sondern nur zu einem fehlerhaften, wiederholten Kreuzen der Mittellinie durch longitudinale Axone. Erst Doppelmutationen von *robo* und *robo2* zeigen einen ähnlich starken Phänotyp wie *slit*; die Axone erkennen das repulsive Signal nicht mehr und verbleiben an der Mittellinie (Rajagopalan et al., 2000a; Simpson et al., 2000a). Zugleich ist die Expression einer Kombination von unterschiedlichen Robo-Rezeptoren für das Sortieren der longitudinalen Axone in drei unterschiedliche Kompartimente innerhalb der Konnektive verantwortlich (Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000b). Das repulsive Signal wird von Robo über eine Interaktion mit Abelson und Enabled an das Zytoskelett des Wachstumskegels weitergeleitet (Bashaw et al., 2000).

Die Wachstumskegel der kommissuralen Axone exprimieren nur sehr geringe Mengen des Robo Proteins während sie über die Mittellinie wachsen, eine Hochregulation erfolgt jedoch, sobald sie die andere Seite erreicht haben. Ipsilateral projizierende Axone hingegen exprimieren konstant große Mengen der unterschiedlichen Robo Proteine. Reguliert wird die Dosis an Robo im Bereich des Wachstumskegels, und somit auch das kontrollierte Kreuzen der Mittellinie, durch das Protein Commissureless (Comm) (Tear et al., 1996; Kidd et al., 1998b). Comm reguliert zellautonom die Menge an Robo, die die neu-synthetisierte Membran innerhalb des Wachstumkegels erreicht. Comm wird nur zum Zeitpunkt des Kreuzens der Mittellinie in kommissuralen Neuronen synthetisiert. Das Transmembranprotein sorgt dann innerhalb des Trans-Golgi Netzwerkes für einen Transport des neu-synthetisierten Robo Proteins in die Endosomen, wo es direkt degradiert wird (Keleman et al., 2002; Myat et al., 2002). Die aktuellen Modelle gehen davon aus, dass Comm selbst schnell degradiert wird, so dass direkt nach Überquerung der Mittellinie wieder genug Robo Protein im Bereich des Wachstumskegels vorhanden ist und ein erneutes Kreuzen der Mittellinie verhindert wird (Keleman et al., 2002; Georgiou and Tear, 2002).

Verantwortlich für die attraktive bzw. repulsive Antwort auf die Netrin bzw. Slit Signale von der Mittellinie sind jeweils die intrazellulären Domänen der unterschiedlichen Rezeptoren (Bashaw and Goodman, 1999). Bei Vertebraten wurde eine direkte Interaktion

Einleitung

zwischen den Rezeptoren der beiden gegensätzlichen Signalwege beobachtet. Die Aktivierung von Robo durch Slit kann die attraktive Wirkung von Netrin auf einen Wachstumskegel neutralisieren, ohne generell das Auswachsen des Wachstumskegels zu behindern (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Diese Interaktion der beiden Signalwege könnte das Kreuzen der Mittellinie durch kommissurale Axone erleichtern, ergänzend zu der Regulation von Robo durch Commissureless,.

Die Antwort der Axone auf das repulsive Slit Signal wird modifiziert durch verschiedene Integrine und ihre Liganden (Stevens and Jacobs, 2002) sowie möglicherweise durch das molekular noch nicht charakterisierte Gen *karussell* (Hummel et al., 1999b).

Innerhalb des ZNS muss nicht nur kontrolliert werden, ob ein Axon die Mittellinie kreuzt, sondern auch innerhalb welcher der beiden Kommissuren die Mittellinie überquert wird. Die Rezeptor-Tyrosin Kinase Derailed wird von Neuronen exprimiert, die in die anteriore Kommissur projizieren. Derailed wirkt als Rezeptor für ein repulsives Wachstumssignal, das innerhalb der posterioren Kommissur vorhanden ist (Bonkowsky et al., 1999). Die Identität des repulsiven Liganden ist noch nicht bekannt.

Bei Säugern sind zwei weitere Ligand-Rezeptor Systeme an der Kontrolle des gerichteten axonalen Wachstums beteiligt: die Semaphorine und ihre Rezeptoren Neuropilin und Plexin (Tamagnone et al., 2000; Raper et al., 2000) sowie die Ephrine und ihre Eph-Rezeptoren (Wilkinson, 2001). Obgleich die einzelnen Komponenten auch bei *Drosophila* vorhanden sind (mit Ausnahme von Neuropilin, siehe Abb. II), sind diese Moleküle nicht wesentlich an der Kontrolle der Kommissurenbildung beteiligt. Das repulsive System Semaphorin-Plexin kontrolliert die Innervierung der somatischen Muskulatur durch Motoneurone (Winberg et al., 1998a; Winberg et al., 1998b; Yu et al., 1998) und das ebenfalls repulsive Ephrin-Eph System sorgt für ein Verbleiben der Interneurone innerhalb des ZNS (Bossing and Brand, 2002).

Die frühe Funktion der Mittellinienzellen ist die strikte Kontrolle der axonalen Projektion über die Mittellinie. Die ML-Neurone sind hauptsächlich für die Attraktion zur Mittellinie zuständig, während die ML-Gliazellen das repulsive Signal Slit sezernieren.

1.3.2 Die Trennung der Kommissuren

Im nächsten Entwicklungsschritt sind die Mittellinienzellen für die Trennung der anterioren und posterioren Kommissur zuständig, die in direkter Nachbarschaft zueinander angelegt werden (Abb. I C, D). Hierbei kommt es zu einer direkten Interaktion der ML-Neurone und ML-Gliazellen. Die ML-Gliazellen migrieren entlang der axonalen Fortsätze der VUM-Neurone, die von der posterioren zur anterioren Kommissur verlaufen. Gleichzeitig beginnen sie die anteriore Kommissur mit ihren basalen Zellausläufern zu umhüllen. Sobald das Soma mit dem Zellkern der ML-Gliazellen zwischen die Kommissuren gelangt, kommt es zu einer sichtbaren Trennung der axonalen Kompartimente (Abb. III; Klämbt et al., 1991; Hummel et al., 1999a). In einem letzten Schritt kommt es zur vollständigen Umhüllung der Kommissur, die gleichzeitig in drei distinkte Axonbündel aufgeteilt wird (Stollewerk and Klämbt, 1997).

Wird diese gliale Migration gestört, so kommt es nicht mehr zu einer Trennung der Kommissuren und ein sogenannter fusionierter Kommissurenphänotyp kann beobachtet werden. Dieser Phänotyp kann durch Fehler bei der Determinierung der ML-Neurone oder ML-Gliazellen hervorgerufen werden oder durch eine Störung der Zell-Zell Interaktion zwischen den beiden Zelltypen (Abb. III; Klämbt et al., 1991; Hummel et al., 1999a).

1.3.2.1 Die Kontrolle der Entwicklung der Mittellinienzellen

Die Entwicklung aller Mittellinienzellen hängt von der Expression des bHLH Transkriptionsfaktors *single-minded (sim)* ab. Der Masterregulator der Mittellinie wird für die Transkription aller Mittelliniengene benötigt (Nambu et al., 1990; Nambu et al., 1991). Die Expression von *sim* beginnt im Mesektoderm in allen Mittellinienzellen, beschränkt sich aber im Laufe der Embryogenese auf die ML-Gliazellen (Crews et al., 1988). Zur Aktivierung der Transkription der Mittelliniengene bildet Sim ein Heterodimer mit Tango (Sonnenfeld et al., 1997; Ward et al., 1998).

1.3.2.2 Die Mittellinien-Gliazellen

Die Entwicklung und das Überleben der ML-Gliazellen wird maßgeblich durch den EGF-Rezeptor-Signaltransduktionsweg kontrolliert. *DER* wird, abhängig von *sim* und *tango*, spezifisch in den ML-Gliazellen exprimiert (Zak et al., 1990; Scholz et al., 1997). Hypomorphe Mutationen von *DER* führen zu einem kompletten Verlust der ML-Gliazellen (Stemerink and Jacobs, 1997). Der Ligand für *DER* in den ML-Gliazellen ist Spitz

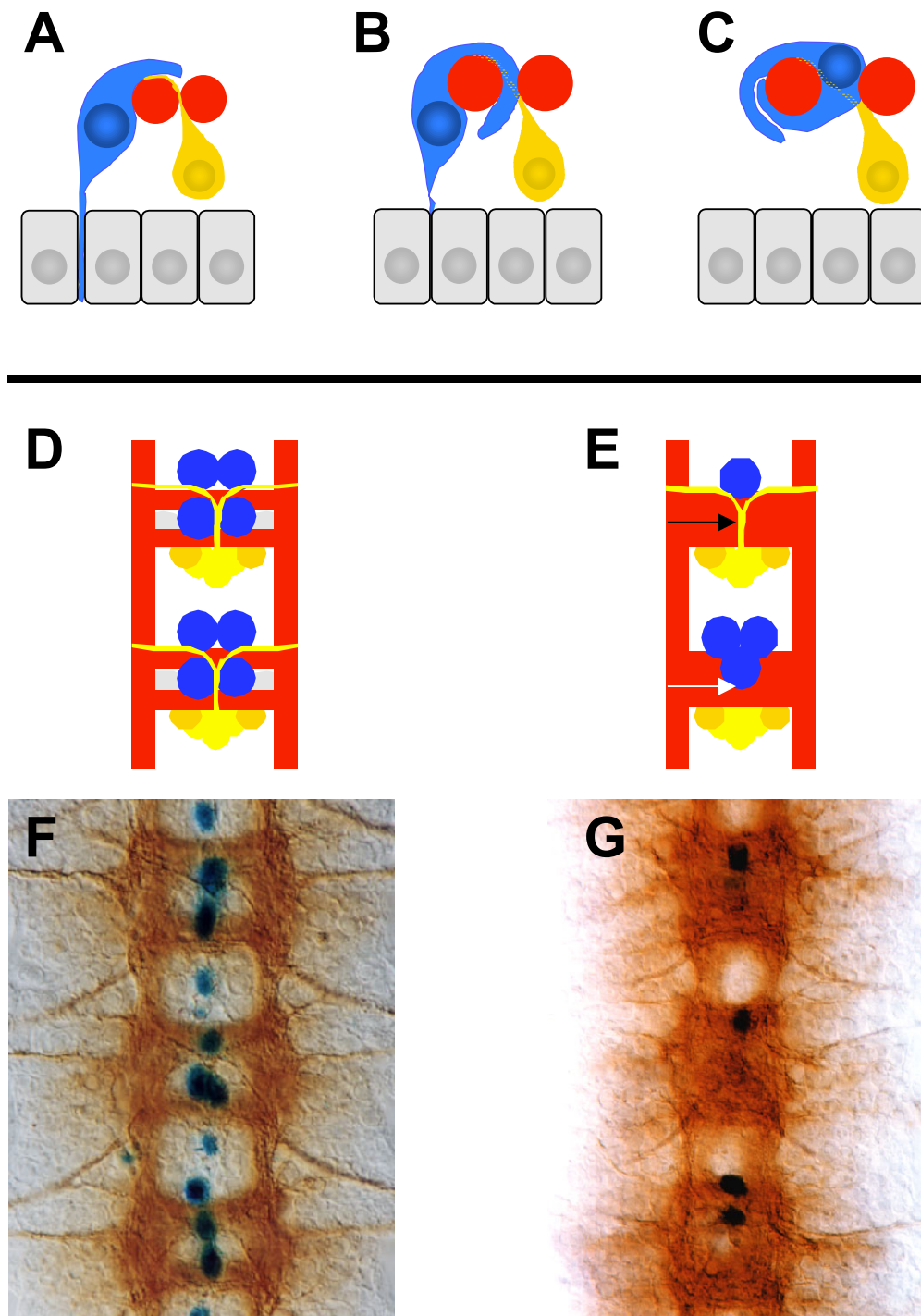


Abb. III Die Commissuren werden durch eine interkalierende Migration der Mittellinien-Gliazellen getrennt. (A-C) Schematische Ansicht, lateral. Die ML-Gliazellen (blau) migrieren entlang der axonalen Fortsätze der VUM-Neurone (gelb) und trennen die anteriore und posteriore Commissur (rot). (D, E) Schematische Ansicht, ventral. (F, G) ZNS-Präparation eines Wildtyps und eines *pointed* mutanten Embryos (G). Die Axone des ZNS wurde durch den mAB BP102 markiert und die ML-Gliazellen durch die Enhancer Trap Insertion *AA142* (blau). Wenn die gliale Migration durch Defekte der Differenzierung der ML-Gliazellen (schwarzer Pfeil in E), der ML-Neuronen (weißer Pfeil in E) oder durch eine Störung der Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen beeinträchtigt wird, werden die Commissuren nicht mehr voneinander getrennt und ein sogenannter fusionierter Commissurenphänotyp entsteht (G).

Einleitung

(Schweitzer et al., 1995; Schnepf et al., 1996; Lanoue et al., 2000). Zur Aktivierung und Sekretion von Spitz innerhalb der Mittellinie sind zwei weitere Gene notwendig: *rhomboid* (*rho*) und *Star*. Der Verlust aller drei Gene führt zu einer Reduktion der Anzahl der ML-Gliazellen, da sowohl die Entwicklung als auch die Regulation der Apoptose in den Zellen gestört ist (Sturtevant et al., 1993; Stemerink and Jacobs, 1997; Lanoue and Jacobs, 1999).

rho und *Star* werden, ähnlich wie *sim*, zunächst im gesamten Mesektoderm und zu späteren Zeitpunkten ausschließlich in den ML-Gliazellen exprimiert. Die membranständigen Proteine Star (1 Transmembrandomäne) und Rho (7 Transmembrandomänen) werden für die Aktivierung von Spitz benötigt. Star sorgt für den Transport von Spitz vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat. Dort kommt es zu einer Aktivierung von Spitz durch eine Abspaltung der intrazellulären Domäne durch die Protease Rho (Lee et al., 2001; Urban et al., 2001). Die prozessierte Form von Spitz wird dann von den Zellen sekretiert und kann an DER binden, um so den EGF-Rezeptor Signaltransduktionsweg zu aktivieren (Schweitzer et al., 1995; Schweitzer and Shilo, 1997).

Über den klassischen Signalweg der Rezeptor-Tyrosin Kinase DER kommt es über Ras zur Aktivierung der MAPK Rolled. Die Expression von aktiviertem Ras führt zu einer erhöhten Anzahl von ML-Gliazellen und der Verlust von Ras zu einer Reduktion der ML-Gliazellen (Casici et al., 1999; Kramer et al., 1999; Scholz et al., 1997). Die aktivierte Form von Rolled aktiviert durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor PointedP2, der die Differenzierung der ML-Gliazellen kontrolliert (Brunner et al., 1994; Klaes et al., 1994; Scholz et al., 1997; Stemerink and Jacobs, 1997). Neben PointedP2 sind auch noch die Transkriptionsfaktoren Drifter und Dichaete an der Kontrolle der ML-Glia Differenzierung beteiligt (Anderson et al., 1995; Soriano and Russell, 1998). Jedoch nur PointedP1 und aktiviertes PointedP2 sind in der Lage, ML-Glia Differenzierung in anderen mesektodermalen Zellen zu induzieren (Klaes et al., 1994).

Der Verlust von *pointed* führt ebenso zu einem fusionierten Kommissurenphänotyp, wie ein Verlust von *rho*, *Star* oder *spitz*. Dieser Phänotyp kommt somit durch eine fehlerhafte Determinierung und Differenzierung der ML-Gliazellen zustande, die dann nicht mehr in der Lage sind die beiden segmentalen Kommissuren voneinander zu trennen (Klämbt et al., 1991; Raz and Shilo, 1992; Stemerink and Jacobs, 1997; Lanoue and Jacobs 1999; Pickup and Banerjee; 1999).

Einleitung

Neben der Aktivierung glia-spezifischer Gene ist auch die Repression neuronaler Gene durch den Transkriptionsfaktor *Tramtrack* bedeutend für die Differenzierung der ML-Gliazellen (Giesen et al., 1997). Zwei große Klassen von Mutationen mit einem fusionierten Kommissurenphänotyp, die entweder *pointed* oder *tramtrack* ähneln, wurden identifiziert (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Möglicherweise befinden sich unter diesen Mutationen direkte Zielgene der beiden Transkriptionsfaktoren. Das einzige, bisher bekannte, direkte Zielgen von *PointedP2* ist *argos*, ein negativer Regulator des EGF-Rezeptor Signaltransduktionsweges (Scholz et al., 1997; Jin et al., 2000).

argos ist an der Induktion des Zelltods in überzähligen ML-Gliazellen durch eine Inhibierung des EGF-Signaltransduktionsweges beteiligt. Von den bis zu 10 initial gebildeten ML-Gliazellen überleben nur ca. 3 Zellen pro Segment, die stets *argos* exprimieren (Stemerdink and Jacobs, 1997). Die Aktivierung des EGF-Signaltransduktionsweges durch Spitz sorgt in den verbleibenden ML-Gliazellen für die Inaktivierung des Apoptose-induzierenden Gens *head involution defective (hid)* (Bergmann et al., 2002). Quelle des Spitz-Signals sind die Axone, die von den ML-Gliazellen umhüllt werden (Bergmann et al., 2002). In Übereinstimmung hiermit findet man auch bei Mutationen des Gens *wrapper* eine Reduktion der Anzahl der ML-Gliazellen am Ende der Embryogenese. *wrapper* kodiert für ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das maßgeblich am letzten Schritt der Axogenese, der korrekten Umhüllung der kommissuralen Axone durch die ML-Gliazellen beteiligt ist (Noordermeer et al., 1998). Der enge Kontakt zwischen ML-Gliazellen und kommissuralen Axonen ist für das Überleben der ML-Gliazellen und folglich für die Trennung und Umhüllung der Kommissuren zwingend notwendig (Sonnenfeld and Jacobs, 1995; Noordermeer et al., 1998; Bergmann et al., 2002).

1.3.2.3 Die Mittellinien-Neurone

Während die frühe Entwicklung der ML-Neurone ebenfalls durch *sim* kontrolliert wird, so endet die *sim* Expression mit Beginn der neuronalen Differenzierung (Crews et al., 1988). Zeitgleich kommt es, wiederum im Gegensatz zur Situation in den ML-Gliazellen, zu einem Stopp der *rhomboid* Expression (Bier et al., 1990; Lanoue and Jacobs, 1999). Für die Differenzierung der ML-Neurone sind besonders die Gene *orthodenticle* und *hedgehog* zuständig (Finkelstein et al., 1990; Hummel et al., 1999a).

Die VUM-Neurone setzen sich aus einer Gruppe von Moto- und Interneuronen zusammen, deren Axone von der posterioren zur anterioren Kommissur projizieren und dann

Einleitung

den kommissuralen Axonen in die Peripherie folgen (Bossing and Technau, 1994). Die axonalen Projektionen der VUM-Neurone von der posterioren zur anterioren Kommissur dienen als Substrat für die Migration der ML-Gliazellen zwischen die beiden Kommissuren (Abb. III). Für eine korrekte Projektion der VUM-Neurone wird das Gen *kette* benötigt. Kette reguliert über die kleinen G-Proteine Rac1 und Cdc42 die Organisation des Aktin-Zytoskeletts innerhalb der axonalen Fortsätze der VUM-Neurone. Die Projektionsfehler der VUM-Neurone in *kette* Mutationen führen zu einer Störung der Migration der ML-Gliazellen und so zu der Entstehung eines fusionierten Kommissurenphänotyps (Hummel et al., 2000).

Die Faktoren, die die direkte Interaktion zwischen den ML-Neuronen und ML-Gliazellen bei der Trennung der Kommissuren regulieren, sind bisher unbekannt. Mögliche Kandidaten hierfür sind die Mutationen der *pointed*-Gruppe, die alle zu einem fusionierten Kommissurenphänotyp führen (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b).

1.3.3 Die Bildung der longitudinalen Konnektive

1.3.3.1 Determinierung der Neurone und Gliazellen

Die ca. 30 Neuroblasten pro Hemisegment werden durch eine komplexe Interaktion zwischen proneuralen und neurogenen Genen determiniert (Campos-Ortega, 1993; Goodman and Doe, 1993). Die Neuroblasten teilen sich in einem Stammzellmodus und generieren so bis zu 12 Ganglion-Mutter-Zellen (GMC). Aus den GMC gehen jeweils 2 Neurone oder ein Neuron und eine Gliazelle hervor (Doe et al., 1991; Knoblich et al., 1995; Hirata et al., 1995; Udolph et al., 1993; Schmid et al., 1999). Ausnahme hierbei sind die Glioblasten, die ausschließlich Gliazellen hervorbringen (Schmidt et al., 1997; Schmid et al., 1999). Die zu nachfolgenden Zeitpunkten entstehenden GMC eines Neuroblasten exprimieren unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (Hunchback, Krüppel, Pdm oder Castor), so dass aus einem Neuroblasten verschiedene neuronale Zelltypen hervorgehen können (Isshiki et al., 2001). Die Nachkommenschaft eines Neuroblasten wird somit durch extrinsische, intrinsische und temporale Faktoren determiniert.

1.3.3.2 Die Funktion der lateralen Gliazellen

Die lateralen Gliazellen sind eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Gliazellen (cell body glia, perineurial glia, interface glia) (Ito et al., 1995). Im Gegensatz zu den Mittellinien-Gliazellen werden sie durch die Expression des Transkriptionsfaktors *glial cells missing*

Einleitung

(*gcm*) determiniert. In Abwesenheit von *gcm* kommt es zu einer Transformation aller lateralen Gliazellen in Neurone und durch eine ektopische Expression von *gcm* kann gliales Schicksal induziert werden (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996; Bernardoni et al., 1998). Die Expression von *gcm* in den Gliazellen ist transient und sorgt für die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren, die für die Differenzierung der Gliazellen wichtig sind: *repo*, *pointedPI* und *tramtrack*.

Während *tramtrack* für die Repression neuronaler Gene nötig ist (Giesen et al., 1997; Badenhorst, 2001), aktivieren *repo* und *pointedPI* Gene, die an der Differenzierung der Gliazellen beteiligt sind. *repo* ist in allen lateralen Gliazellen exprimiert, bisher sind allerdings noch keine Zielgene dieses Homeodomänen-Transkriptionsfaktors bekannt. Mutationen in *repo* führen zu Defekten der terminalen Differenzierung der Gliazellen. Aufgrund der trophischen Abhängigkeit der Neurone von den Gliazellen kommt es zur Induktion von Apoptose in einigen Neuronen und zu einer Beeinträchtigung der longitudinalen Axonwege (Xiong and Montell, 1995; Campbell et al., 1994; Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995). Auch Mutationen in *pointedPI* führen zu einer Beeinträchtigung glialer Differenzierung. Die Gliazellen können die Axone nicht mehr vollständig mit ihren zellulären Fortsätzen umhüllen und von der umgebenden Hämolymphe isolieren; die Reizweiterleitung der Axone ist gestört (Klaes et al., 1994).

Im Gegensatz zu *repo* ist *pointedPI* fähig bei ektopischer Expression eine partielle, gliale Differenzierung in neuronalen Zellen zu induzieren (Klaes et al., 1994). Als erstes direktes Zielgen von *pointedPI* wurde das RGS (Regulators of G-Protein signalling) Domänen Protein *loco* identifiziert (Granderath et al., 1999). *pointedPI* aktiviert zusammen mit *gcm* die Expression von *loco* in den lateralen Gliazellen (Granderath et al., 2000). *loco* ist ähnlich wie *pointedPI* für Etablierung von Glia-Glia Zellkontakten und die Isolierung der longitudinalen Axone gegen die Hämolymphe zuständig (Granderath et al., 1999).

Die Bildung und Aufrechterhaltung der longitudinalen Konnektive wird, ebenso wie die Bildung der Kommissuren, teilweise durch eine Interaktion von Neuronen und Gliazellen kontrolliert. Für die initiale Bildung der ersten Axonfaszikel durch die Pionier-Neurone sind die Gliazellen jedoch nicht von wesentlicher Bedeutung (Hidalgo and Booth, 2000; Takizawa and Hotta, 2001). Hingegen kommt es zu Störungen der Separation von Axonen aus einem Faszikel (Defaszikulation) und bei der Bildung neuer Faszikel durch Axone (Faszikulation), wenn die lateralen Gliazellen fehlen (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996; Hidalgo and Booth, 2000; Takizawa and Hotta, 2001). Während im Wildtyp drei

Einleitung

Fasciclin II-positive Axonbündel auf jeder Seite der Mittellinie zu beobachten sind, kommt es nach genetischer Ablation der lateralen Gliazellen (*gcm* mutante Embryonen bzw. Expression des Toxins Ricin A in den Gliazellen) nur noch zur Bildung eines einzigen, dicken Faszikels. Hierbei sind die Effekte nach einer Ablation der Zellen durch Ricin A deutlich stärker als die Effekte in *gcm* mutanten Embryonen. Möglicherweise haben die *gcm*-negativen Zellen, obgleich sie den glialen Marker *repo* nicht mehr exprimieren, immer noch Einfluß auf die Faszikulation der Neurone (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996; Hidalgo and Booth, 2000; Takizawa and Hotta, 2001).

Interessanterweise verhindert das Robo/Slit System nicht nur zu häufiges Kreuzen der Mittellinie und kontrolliert die Sortierung der longitudinalen Axone (Kidd et al., 1999; Rajagopalan et al., 2001b; Simpson et al., 2001b), sondern sorgt auch für eine korrekte Positionierung der lateralen Gliazellen (Kinrade et al., 2001). Es kommt zu einer Expression von Robo in den lateralen Gliazellen, bis sie einen direkten Kontakt mit den Pionieraxonen des medianen Faszikels etabliert haben. Anschließend sind die Gliazellen auf direkten Kontakt mit den Axonen angewiesen, um zu überleben. Die trophische Abhängigkeit von den Neuronen verankert somit die Gliazellen an den Pionieraxonen. Später in der Entwicklung sind dann sowohl Gliazellen als auch Neurone auf den gegenseitigen direkten Kontakt angewiesen (Scholz et al., 1997; Booth et al., 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Die Interaktionen von Neuronen und Gliazellen sind entscheidend für die Entwicklung und Funktion des embryonalen Nervensystems von *Drosophila*. Die ML-Gliazellen und die lateralen Gliazellen treten auf vielfältige Weise und bei vielen verschiedenen Prozessen in direkten Kontakt mit Neuronen. Die Analyse einer großen Anzahl Mutationen, bei denen die Entwicklung des Nervensystems gestört ist, hat gezeigt, dass besonders der Prozess der Kommissurentrennung durch eine Vielzahl von Genen reguliert wird (Hummel et al., 1999a). Für das Verständnis der Mechanismen, die an diesem Prozess beteiligt sind, ist eine genaue Kenntnis der wildtypischen Situation notwendig. In einem ersten Ansatz sollte die Interaktion zwischen ML-Gliazellen und ML-Neuronen im Wildtyp durch eine konfokale Analyse und die gleichzeitiger Markierung beider Zelltypen genauer charakterisiert werden.

Hauptziel der Arbeit war die phänotypische und molekulare Charakterisierung von drei Mutationen der *pointed*-Gruppe, *klötzchen*, *kästchen* und *schmalspur*, die zu einem fusionierten Kommissurenphänotyp führen (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b).

Einleitung

Die Funktion der entsprechenden Gene bei der Interaktion von Neuronen und Gliazellen sollte durch eine detaillierte phänotypische Charakterisierung der Mutationen geklärt werden. Die Analyse sollte sich nicht auf die auf Embryogenese beschränken, sondern postembryonale Funktionen mit einbeziehen, um so zusätzliche Hinweise über mögliche Interaktionen der Gene mit Komponenten bekannter Signalwege zu erlangen. Gleichzeitig sollte versucht werden die entsprechenden Gene molekular zu identifizieren.

Nach der Bestimmung der molekularen Identität sollte mit einer funktionellen Charakterisierung der Gene begonnen werden. Hierzu sollten z. B. das Expressionsmuster, die subzelluläre Verteilung des Proteins oder die Auswirkungen der ektopischen Expression des Gens untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sollten zusammen mit den Befunden der phänotypischen Charakterisierung zu neuen Erkenntnisse über die Regulation von Neuron-Glia Interaktionen in *Drosophila* führen.

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)	La Rouche (Mannheim)
GIBCO/BRL (Eggenstein)	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, Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18 g Agar / 500 ml H ₂ O, autoklavieren, 100 ml H ₂ O zugeben, aufkochen, 3 ml Eisessig zugeben.
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid
BLB-Puffer	2 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 1 mM PMSF 10% Glycerin in 1x PBS
Church-Hybridisierlösung	0,5 M Church-Stammlösung, pH 7,2 7% SDS
Church-Stammlösung	1 M Na ₂ HPO ₄ , mit H ₃ PO ₄ auf pH 7,2 einstellen.
Church-Waschlösung	40 mM Church-Stammlösung 1% SDS
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie R250 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure
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.

Material und Methoden

<i>Drosophila</i> -Standardmedium	pro Liter Leitungswasser: 8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup hinzugeben und auf eine Temperatur von 60°C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Eßlöffel Nipagin hinzugeben.
G2-Puffer	800 mM Guanidin-HCL 30 mM Tris-HCL, pH 8,0 30 mM EDTA, pH 8,0 5% Tween 20 0,5% Triton X-100
Heptan-Fix	400 ml 5% Formaldehyd in PBS 1:1 mit Heptan auffüllen, kräftig schütteln und nach Phasentrennung die gesättigte Heptanphase zur Fixierung verwenden.
Heptankleber	Zerkleinertes Klebeband (Tesapack; Beiersdorff, Hamburg) wird in einer Weithalsflasche (500 ml) mit 150 ml Heptan überschichtet. Durch Schütteln (ca. 5 h) den Kleber in Heptan lösen. Den Überstand für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand als Kleber verwenden.
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 (pUAST-Konstrukt) 1,5 µg Helper-DNA (pUChsΔ2-3; Laski et al., 1986) 1 µl rote Lebensmittelfarbe 1,5 µl 10x Injektionspuffer ad 15 µl H ₂ O
Injektionspuffer (10x)	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, auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
LB-Agarplatten	24 g Agar / 1 l Medium
Loading Buffer	4 M Harnstoff 50% Saccharose 50 mM EDTA < 0,001% Xylencyanol < 0,001% Bromphenolblau

Material und Methoden

Natriumhypochloritlösung	10-15% aktives Chlor (NaOCl) (Schindler & Co.) 1:1 mit H ₂ O 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
NZY-Medium	10 g NZ-Amine 5 g NaCl 5 g Bacto Yeast Extract 1 g Casamino Extract 2 g MgSO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l H ₂ O, auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
Puffer A	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl, pH 7,6
PBT	0,1 % 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
QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100
QC	1 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
QF	1,25 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 8,5 15% Isopropanol
RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem ddH ₂ O
SDS-Page	
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH8,8
Sammelgel 4% (10ml)	1,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Roth) 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer 0,1 ml 10% SDS 6,0 ml ddH ₂ O 100 µl 10% APS 10 µl TEMED

Material und Methoden

Trenngel 10% (30 ml)	10 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Roth) 7,5 ml 4x Trenngelpuffer 0,3 ml 10% SDS 12,1 ml ddH ₂ O 300 µl 10% APS 20 µl TEMED
2x SDS-Probenpuffer	0,125 M Tris 4% SDS 20% Glycerol 0,02% Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol, auf pH 6,8 einstellen.
Elektrodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS, auf pH 8,3 einstellen.
SB-Medium	35 g Trypton 20 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1l H ₂ O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
SDS (10%)	10 % Natriumdodecylsulfat in ddH ₂ O
SM-Puffer	10 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM 1 M Tris/HCl, pH 7,5
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 und auf 20 mM Glucose einstellen.
SquiB	10 mM Tris, pH 8,2 1 mM EDTA 25 mM NaCl, vor 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, pH7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween 20

Material und Methoden

TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,2 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 129 mM Glycin 10% MetOH pH 8,2 - 8,4
Tris/HCl	1 M Trisbase mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen.
2x YT	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1l H ₂ O pH 7,5 mit 10N NaOH einstellen und autoklavieren.

2.1.3 Vektoren

pBlueskript SK+	Standardklonierungen	Stratagene GmbH, Heidelberg
pOT2	cDNA-Klonierungsvektor	BDGP
pGEM T-Easy	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Mannheim
pGEX-4T-1	Fusionsprotein-Expressionsvektor	Amersham
pUAST	P-Element Transformationsvektor	Brand and Perrimon, 1993
pWIZ	Vektor für RNAi-Konstrukte	Lee and Carthew, 2002

2.1.4 Bakterienstämme

DH5 α	(GIBCO/BRL, Eggenstein)
XI-1blue	(GIBCO/BRL, Eggenstein)
BL21	(Amersham Pharmacia Biotech)

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Quelle
BP102	Maus	1:50	Patel & Goodman, unveröffentlicht
22C10 (anti-Futsch)	Maus	1:50	Fujita et al., 1982
1D4 (anti-FasciclinII)	Maus	1:5	Helt and Goodman, unveröffentlicht
anti-CD2	Kaninchen	1:1000	Serotec
anti- β -Galactosidase	Kaninchen	1:5000	Cappel
anti-Elav	Ratte	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank

Material und Methoden

anti-GST	Maus	1:10.000	Amersham
anti-HRP-FITC	Ziege	1:100	Dianova
anti-Repo	Maus	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Repo	Kaninchen	1:500	Halter et al., 1995
anti- α -Spectrin (3A9)	Maus	1:50/100	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti- α -Spectrin	Kaninchen	1:1000	Byers et al., 1987
anti- β 3-Tubulin	Kaninchen	1:5000	Kimble et al., 1989
anti-Vasa	Kaninchen	1:200	Lasko and Ashburner, 1990

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Herkunft / Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Quelle
Ziege anti-Maus	HRP	1:500	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	Alkalische Phosphatase	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	HRP	1:500	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Ratte	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
anti-Digoxigenin	Alkalische Phosphatase	1:2000	Roche

2.1.6 Verwendete Fliegenstämme

2.1.6.1 Allgemeine Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
<i>OregonR</i>	Wildtyp	Lindsley & Zimm, 1992
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w⁻</i> , sonst wildtypisch	Lindsley & Zimm, 1992
<i>w⁻; Δ2-3, Ki, p^p/ TM3</i>	konstitutiv-aktive Transposase auf dem 3. Chromosom	Robertson et al., 1988
TM2, <i>Ubx</i>	Balancer 3. Chromosom	Lindsley & Zimm 1992
TM3 ^{bb} , <i>Sb P[ry⁺, ftz-lacZ]</i>	Balancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht

Material und Methoden

TM6 ^{bb} , <i>Tb</i> P[<i>w</i> ⁺ , <i>Ubx-lacZ</i>]	Balancer 3. Chromosom	Vässin, unveröffentlicht
<i>w</i> ⁻ ; ; TM3, <i>Sb</i> / TM6B, <i>Hu Tb</i>	Doppelbalancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w</i> ⁻ ; CyO/Sp; TM3/TM6B	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w</i> ⁻ ; CyO ^{bb} P[<i>ry</i> ⁺ , <i>elav-lacZ</i>]/Sp; TM2/TM6B ^{bb} P[<i>w</i> ⁺ , <i>Ubx-lacZ</i>]	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht

2.1.6.1 P-Element Insertionen und Enhancer Trap Linien

Bezeichnung	Lokalisation	Quelle
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)3673	62A-B	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)3486	62A-B	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)0304	62A-B	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)3143	62A-B	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)0522	62A-B	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)3081	62A-B	Rorth et al., 1996
<i>y</i> ¹ <i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; P[<i>w</i> ^{+mC} = <i>lacW</i>]l(3)j8E8/TM3	66D05-06	Bloomington
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)0595	66D05-06	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; EP(3)3212	66D05-06	Rorth et al., 1996
<i>w</i> ¹¹¹⁸ P[<i>w</i> ^{+mC} = <i>lacW</i>]rP298	5' <i>dumbfounded</i> (Muskel-Gründerzellen)	Ruiz-Gomez et al., 2000
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; P[<i>w</i> ^{+mC} = <i>lacW</i>]J29	5' <i>gliotactin</i> (periphere Gliazellen)	Auld et al., 1995
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; ; P[<i>w</i> ^{+mC} = <i>lacW</i>]AA142	66D06 (Mittellinien-Gliazellen)	Hummel et al., 1999a

2.1.6.2 Verwendete Mutationen

Allel	Gen	Quelle
<i>klo</i> ^{D4-65} <i>st e</i>	<i>klötzchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>klo</i> ^{E2-25} <i>st e</i>	<i>klötzchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>klo</i> ^{E2-26} <i>st e</i>	<i>klötzchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>klo</i> ^{E2-66} <i>st e</i>	<i>klötzchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>klo</i> ^{N2-141} <i>st e</i>	<i>klötzchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>kas</i> ^{B1-89} AA142(P[<i>w</i> ⁺ , <i>lacZ</i>]) <i>st e</i>	<i>kästchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>kas</i> ^{D3-66} AA142(P[<i>w</i> ⁺ , <i>lacZ</i>]) <i>st e</i>	<i>kästchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>kas</i> ^{O1-41} <i>st e</i>	<i>kästchen</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>sur</i> ^{D1-38} <i>h th st cu sr st e</i>	<i>schmalspur</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>sur</i> ^{D3-69} <i>h th st cu sr st e</i>	<i>schmalspur</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a
<i>sur</i> ^{D4-19} <i>h th st cu sr st e</i>	<i>schmalspur</i> EMS-Allel	Hummel et al., 1999a

Material und Methoden

<i>E(sev)3B</i>	<i>cdc37</i> Allel	Cutforth and Rubin, 1994
α - <i>spec</i> ^{rg41}	amorphes α - <i>spectrin</i> Allel	Lee et al., 1993
α - <i>spec</i> ^{rg35}	hypomorphes α - <i>spectrin</i> Allel	Lee et al., 1993
α - <i>spec</i> ^{lm32}	α - <i>spectrin</i> Allel	Lee et al., 1993
α - <i>spec</i> ^{lm88}	α - <i>spectrin</i> Allel	Lee et al., 1993
<i>P(UPS)</i>	α - <i>spectrin</i> Minigen, X-Chrom.	Lee et al., 1993
<i>dlt</i> ^{My10}	<i>discs lost</i> Defizienz	Bhat et al., 1999
<i>dlt</i> ^{dre1}	<i>discs lost</i> Allel	Bhat et al., 1999
<i>hh</i> ^{bar3} (= <i>hh</i> ¹)	vitales <i>hedgehog</i> Allel	Bloomington
<i>hh</i> ^{AC}	amorphes <i>hedgehog</i> Allel	Bloomington
<i>rhea</i> ¹	<i>rhea</i> Allel	Bloomington
<i>n-syb</i> ^{F33}	<i>n-synaptobrevin</i> P-Element	Deitcher et al., 1998
<i>n-syb</i> ^{ΔF33B}	<i>n-synaptobrevin</i> Defizienz	Deitcher et al., 1998
<i>n-syb</i> ^{ΔF82C}	<i>n-synaptobrevin</i> Defizienz	Deitcher et al., 1998

2.1.6.3 GAL4-Treiberlinien

Bezeichnung	Muster/Promotor	Chromosom	Quelle
24B-GAL4	<i>myosin-heavy chain</i>	III	Schuster et al., 1996
<i>rho</i> -GAL4	<i>rhomboid</i>	II bzw. III	Ip and Levine, unveröffentlicht
<i>da</i> -GAL4	<i>daughterless</i>	III	Wodarz et al., 1995
<i>sim</i> -GAL4	<i>single-minded</i>	II bzw. III	Scholz et al., 1997
<i>sli</i> -GAL4	<i>slit</i>	II	Klämbt et al., 1996
<i>elav</i> -GAL4	<i>elav</i>	X bzw. III	Lin and Goodman, 1994
<i>loco</i> -GAL4	<i>loco</i>	II bzw. III	Granderath et al., 1999
<i>sca</i> -GAL4	<i>scabrous</i>	II	Hinz et al., 1994
<i>dpp</i> -GAL4	<i>decapentaplegic</i>	III	Bloomington
<i>GMR</i> -GAL4	<i>glass</i> Multimer Reporter	II	Ellis et al., 1993
<i>ey</i> -GAL4	<i>eyeless</i>	II	Bloomington
<i>en</i> -GAL4	<i>engrailed</i>	III	Bloomington
<i>ptc</i> -GAL4	<i>patched</i>	III	Bloomington
<i>pnr</i> -GAL4	<i>pannier</i>	III	Bloomington

2.1.6.4 UAS-Effektorlinien

Bezeichnung	Gen	Chromosom	Quelle
UAS- <i>CD2</i>	<i>CD2</i> der Ratte	II	Bloomington
UAS- <i>CG32315</i>	<i>klötzchen</i>	X, II, III	diese Arbeit
UAS- <i>CG6817</i>	<i>kästchen</i>	X, II, III	diese Arbeit
UAS- <i>GST-I</i>	<i>Glutathion-S-Transferase</i>	X, II, III	diese Arbeit
UAS- <i>CG13928</i>	<i>schmalspur</i>	X, II, III	diese Arbeit

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Fliegenzucht

Alle Fliegenstämme wurden auf *Drosophila*-Futtermedium in Standard-Plastiktöpfen bei 25°C gehalten. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen (≤ 10 h nach Verlassen des Pupariums bei 18 °C) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.1.2 Sammeln von Embryonen

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

2.2.1.3 Meiotische Kartierung gegen P-Element-Insertionen

Bei der Kartierung gegen eine P-Element-Insertion nutzt man die dominante w^+ -Markierung eines $P[w^+, lacZ]$ -Elements oder eines $EP[w^+]$ -Elements im w^- -Hintergrund. Es spielt keine Rolle, ob die P-Element-Insertion letal oder vital ist, solange sie nicht den zu kartierenden Letalitätsfaktor betrifft. Das P-Element tragende Chromosom wurde in Transheterozygose zu dem Chromosom mit dem Letalitätsfaktor gebracht. Jungfräuliche Weibchen dieses Genotyps wurden gegen Männchen eines anderen Allels (w^- -Hintergrund) der Komplementationsgruppe zurückgekreuzt und die relative Anzahl w^- zu w^+ -Tieren bestimmt, die den meiotischen

Material und Methoden

Abstand des Letalitätsfaktors zur P-Element-Insertion angibt. (In allen Kreuzungsschemata ist links der Genotyp der Jungfrauen und rechts der Genotyp der Männer angegeben.)

Kreuzungsschema (Beispiel *sur*):

$$\begin{array}{l} w^- / w^-; ; sur^{D3-96} / TM6B \\ w^- / w^-; ; sur^{D3-96} / EP(3)3143[w^+] \end{array} \quad \begin{array}{l} \times \\ \times \end{array} \quad \begin{array}{l} w^- / Y; ; EP(3)3143[w^+] \\ w^- / Y; ; sur^{D4-019} / TM6B \end{array}$$

auftretende Phänotypen:

$$\begin{array}{l} w^-; ; EP(3)3143[w^+] / sur^{D4-19} \\ w^-; ; + / sur^{D4-19} (w^- \text{-Tiere}) \end{array}$$

2.2.1.4 $\Delta 2-3$ -Reversionsmutagenese

Zur Reversion der P-Element-Insertionen wurde das $\Delta 2-3$, *Ki*, *p^p*-Chromosom eingekreuzt, welches ein stabil integriertes P-Element mit hoher Transposase-Aktivität und den dominanten Marker *Ki* zur leichten Wiedererkennung des Chromosoms besitzt (Robertson et al., 1988). Die Mobilisierung drittchromosomal lokalisierter P-Elemente verläuft nach dem unten dargestellten Kreuzungsschema. Um z. B. den Verlust eines P[*w⁺*]-Elements sichtbar machen zu können, muß die Exzision im *w⁻*-Hintergrund durchgeführt werden (das P[*w⁺*]-Element verhält sich dann wie ein dominanter Marker).

Jungfräuliche Weibchen des P-Element-Stammes wurden gegen Männchen des $\Delta 2-3$ -Stammes gekreuzt. Männliche Nachkommen, die sowohl das $\Delta 2-3$ -Chromosom als auch die P-Element-Insertion tragen, wurden in Einzelkreuzungen gegen TM3/TM6B-Weibchen ausgekreuzt. In der F2-Generation auftretende *w⁻*, *Ki⁺*-Männchen wurden zur Etablierung eines Stammes in der F3-Generation erneut gegen TM3/TM6B-Weibchen gekreuzt. Hierbei ist auf den Verlust des $\Delta 2-3$ *Ki*, *p^p*-Chromosoms zu achten.

Der balancierte Stamm kann anschließend sowohl auf die erfolgte Reversion einer möglichen P-Element-induzierten Letalität durch präzise Exzision (bei Selbstung nicht mehr letal), als auch auf die Induktion einer Mutation aufgrund unpräziser Exzision des P-Elementes untersucht werden (Test im vorliegenden Beispiel gegen ein *schmalspur*-Allel).

Als Beispiel ist im folgenden Kreuzungsschema die Reversion der drittchromosomalen EP-Element-Insertion *EP(3)0304*[*w⁺*] aufgeführt.

Kreuzungsschema:

$$\begin{array}{l} w^- / w^-; EP(3)0304 [w^+] / TM3 \\ w^- / w^-; TM3 / TM6B \\ w^- / w^-; TM3 / TM6B \end{array} \quad \begin{array}{l} \times \\ \times \\ \times \end{array} \quad \begin{array}{l} w^- / Y; \Delta 2-3, Ki, p^p / TM3 \\ w^- / Y; EP(3)0304[w^+] / \Delta 2-3 Ki p^p \\ w^- / Y; \Delta EP(3)0304[w^-] / TM3 \text{ (Einzelkreuzungen)} \end{array}$$

Etablierung des Stammes

w^- / w^- ; $\Delta EP(3)0304[w^-] / TM6B$ x sur-Allel / TM6B letal?

2.2.1.5 Bestimmung der Letalitätsphase

Fliegen eines zu untersuchenden Stammes wurden gegen den Wildtyp-Stamm OregonR ausgekreuzt. Die Nachkommen der F1-Tiere (ohne Balancer) wurden hinsichtlich ihrer Letalitätsphase untersucht. Dazu wurden die F1-Tiere auf frische Apfelsaft-Agarplatten gesetzt und die Ablage alle 12h gewechselt. Anschließend wurde die Ablage weitere 36 h bei 25°C inkubiert und danach das Verhältnis von Embryonen zu geschlüpften Larven bestimmt. Bei einem annähernden Verhältnis von 1:4 handelt es sich um eine embryonal letale Mutation. Falls nur eine geringe Anzahl an Embryonen zu finden war, wurde die Ablage weiter bei 25°C inkubiert und auf larvale Letalität untersucht. Eine pupale Letalitätsphase erkennt man an nicht geschlüpften, schwarzen Puppen im Kulturgefäß.

2.2.1.6 Keimbahntransformation

Zur Keimbahntransformation wurde ein Eppendorf Transjektort 5246 eingesetzt.

Für die Injektionen wurden nachgeschliffene (30°) *femtotipsII*-Kanülen (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Vor dem Aufsetzen auf das Injektionssystem wurde die *femtotipII*-Kanüle mit 5 µl Injektionsmix befüllt.

2.2.1.6.1 Präparation der Embryonen

Zur Injektion wurden w^{1118} -Embryonen verwendet. Die Fliegen werden für auf Apfelsaftagarplatten zur Ablage gesetzt. Die Platten wurden 1 x pro Stunde gewechselt und die Embryonen zur Injektion verwendet.

Die Embryonen wurden mit einem Pinsel auf einen mit doppelseitigem Klebeband präparierten Objektträger transferiert. Mit einer Präpariernadel wurden die Embryonen manuell dechorionisiert und in einer Reihe auf einem Agarblock angeordnet (ca. 100 Embryonen/Reihe). Die Embryonen wurden mit einem mit Heptankleber beschichteten Deckglas aufgenommen und für ca. 20 min getrocknet (bis sich Falten in der Vitellinmembran zeigen). Anschließend wurden die Embryonen mit 10S-Öl (Voltalef) überschichtet und für die Injektion verwendet.

2.2.1.6.2 Injektion eines UAS-Konstruktes

Embryonen und Injektionskanüle wurden an einem Inversen-Mikroskop (Leica) in einer Ebene ausgerichtet. Injektionen erfolgten nur in Embryonen, die sich noch im syncytialen

Blastoderm Stadium befanden. Die Kanüle wurde in den posterioren Pol des Embryos gestochen und durch Betätigen der Injektionstaste des Transjektors wurde eine kleine Menge des Injektionsmixes in den Embryo injiziert. Die erfolgreiche Injektion kann anhand der roten Farbe des Injektionsmixes nachvollzogen werden. Nach erfolgter Injektion aller Embryonen wurde das Deckglas in ein Wägeschälchen überführt und mit 3S-Öl (Votalev) überschichtet. Die Embryonen wurden bis zum Schlüpfen bei 18°C inkubiert. Die L1-Larven wurden mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila*-Standardmedium überführt.

2.2.1.6.3 Selektion transgener Fliegen

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

2.2.1.6.3 Bestimmung des Insertionsortes

Zur Bestimmung des Chromosoms auf dem die Insertion stattgefunden hat, wurden die transgenen Tiere erneut gegen Doppelbalancer-Fliegen gekreuzt. Anhand des Segregationsverhaltens der dominanten Marker und der w^+ -Markierung der transgenen Fliegen konnte so das Chromosom, das die Insertion des UAS-Konstruktes trägt, identifiziert werden. Die transgenen Stämme wurden durch Selbstung über den entsprechenden Balancer-Chromosomen etabliert.

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Kutikula-Präparationen

Das balancierte, mutante Chromosom wurde gegen den Wildtyp-Stamm OregonR ausgekreuzt. In der folgenden Generation wurden die Tiere ohne Balancer-Chromosom geselbstet und auf Ablage gebracht. Die Ablage wurde alle 12 h gewechselt und weitere 48 h bei 25°C inkubiert. Vor der Inkubation streicht man an den Rand der Ablageplatte etwas Hefe, um alle wildtypischen Larven dort zu konzentrieren und entfernen zu können. Anschließend wurden alle braunen, d.h. tote Embryonen mit PBT von der Ablageplatte gewaschen. Nach chemischer Dechorionisierung (5 min in 50% NaOCl) wurden die Embryonen erneut gewaschen und in einen Tropfen Hoyer's Medium/Milchsäure (1:1) überführt, eingedeckelt

und durch leichten Druck auf das Deckgläschen devitellinisiert. Zur Klärung wurden die Kutikula-Präparationen bei 65°C ü. N. inkubiert.

2.2.2.2 whole-mount Antikörperfärbung von *Drosophila*-Embryonen

Fixierung der Embryonen

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 50% NaOCl für 4 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 Fixierungslösung (4% Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wäßrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- zur Devitellinisierung ca. 10 sec kräftig schütteln
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurz schütteln
- Abnahme des Methanols und 1 x mit 96% Ethanol waschen

Hybridisierung der Antikörper

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

Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

- Embryonen 2 x 5 min in NBT-Puffer waschen
- Embryonen in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT-Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist (5-10 min)
- 3 x kurz mit PBT waschen

Material und Methoden

- 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- in 70% Glycerin überführen

Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung

- Embryonen 1 x in PBS waschen
- Inkubation der Embryonen in 0,3 mg/ml DAB-Lösung in PBS und 1,5 µl/ml H₂O₂
- Stoppen der Färbereaktion mit 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 Präabsorption des anti-β-Galaktosidase Antikörpers

- Fixierung der Embryonen wie bei der *whole-mount* Antikörperfärbung
- 3 x kurz und anschließend 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation in 10% GS/PBT für 1 h bei RT
- Inkubation des anti-β-Galaktosidase AK (Verdünnung 1:500) in 10% GS/PBT ü. N. bei 4°C
- Überstand sterilfiltrieren, bei 4°C lagern und bei Bedarf in einer Verdünnung von 1:5-1:10 einsetzen

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

Fixierung der Embryonen

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in MWP überführt
- Dechorionisierung mit 5% NaOCl für 4 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 Fixierungslösung (8% Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 30 min bei RT auf einem Schüttler (1. Fixierung)
- Abnahme der wäßrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- zur Devitellinisierung ca. 10 sec kräftig schütteln

Material und Methoden

- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurz schütteln
- Abnahme des Methanols und 1 x mit 96% Ethanol waschen
- Lagerung bei -20°C möglich

Hybridisierung

- 2 x 5 min mit PBT waschen
- Embryonen in 95° - 100° heißem Wasser 6 min inkubieren, dabei 2-3 Mal invertieren
- 15 min auf Eis inkubieren
- 2 x kurz mit PBT waschen
- 20 min in 5% Formaldehyd/PBT fixieren (2. Fixierung)
- 3 x 2 min waschen mit PBT
- 5 min Waschen mit PBT/Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1
- 5 min Waschen mit Hybridisierungspuffer
- Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei 50°C für mind. 80 min
- RNA-Probe in 30 µl Hybridisierungslösung für 2 min bei 90° denaturieren, direkt auf Eis stellen
- alte Hybridisierungslösung abnehmen
- Zugabe der denaturierten RNA-Probe zu den Embryonen, Inkubation bei 50-60°C ü. N.
- 30 min in Hybridisierungspuffer bei 50°C waschen
- 30 min in Hybridisierungspuffer/PBT bei 50°C waschen
- 5 x 20 min in PBT bei 50°C waschen
- 10 min in PBT bei RT waschen
- Inkubation mit anti-Digoxigenin-AP Antikörper/PBT (1:2000) für 2 h
- 5 x 10 min in PBT bei RT waschen

Nachweisreaktion

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

Einbetten der Embryonen

- Entwässern der Embryonen in einer Alkoholreihe: 50%, 70%, 90%, 95%, 100% Ethanol
- 100% Ethanol gegen 4:1 Kanadabalsam-Methylsalicylat austauschen

- Deckglas auflegen

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde

In ein eisgekühltes Eppendorfgefäß werden gegeben:

- 1 µg linearisierte Plasmid-DNA
- 2 µl 10x DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
- ad 18 µl RNase-freies ddH₂O
- 2 µl RNA-Polymerase (SP6, T7 oder T3) (Roche)
- mischen und leicht abzentrifugieren
- 2h bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 2 µl DNaseI, 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 -20°C 2 h (oder -70°C 30 min) fällen
- bei 4°C für 30 min mit 12.000 g zentrifugieren
- mit 50 µl 70% EtOH waschen, trocknen und in 100 µl RNase-freiem H₂O aufnehmen
- bis zur Verwendung bei -20°C einfrieren.

2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Herstellung von transformationskompetenten XL-1blue oder DH5-alpha *Escherichia coli*

- 2 x 0,5 l LB-Medium mit 10 ml einer frischen ü. N.-Kultur animpfen
- Im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 inkubieren (3-5 h)
- Kultur 15-20 min auf Eis stellen
- in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 l kaltem ddH₂O resuspendieren
- in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 0,5 l kaltem ddH₂O resuspendieren
- in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren

Material und Methoden

- Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendieren
- in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in ca. 2 ml kaltem 10% Glycerin/ddH₂O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca. $1-3 \times 10^8$ Zellen/ml)
- 50 µl Aliquots der Suspension auf Eis herstellen und bei -70°C lagern.

2.2.3.3 Bakterientransformation (Elektrotransformation)

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

- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- 50 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA-Menge (1-2 µl) mischen
- in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführen
- Küvette in Gene Pulser (BIORAD) einsetzen
- Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellung am Gene Pulser: Kapazität -25 µF, Spannung -1,8 KV, Widerstand -200 Ω)
- Küvette schnell entnehmen und 250 µl SOC-Medium zugeben (vorgewärmt)
- im Schüttler bei 37 °C für 30 min inkubieren
- auf einem geeigneten Selektions-Medium ausstreichen und ü. N. kultivieren.

2.2.3.4 DNA-Restriktionen

Die DNA-Restriktionen erfolgten gemäß der Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme (Roche).

2.2.3.5 Gelelektrophorese

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

2.2.3.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde bei einer 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 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde ein zweckmäßiges Volumen auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Standard diente 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 erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf).

2.2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

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

Ligationsansatz:	100 ng	Vektor-DNA
	1-4fache	molare Menge des DNA-Fragments
	2 µl	10 x Ligationspuffer (Promega)
	1 µl	T4-DNA-Ligase (Promega)
	ad 20 µl H ₂ O	
	Inkubation 1 h bei 22 °C oder ü. N. bei 16 °C	

2.2.3.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

- 2 ml LB-Medium (mit Antibiotika zur Selektion) mit Einzelkolonien animpfen
- ü. N. bei 37°C im Schüttler inkubieren
- ca. 1,5 ml Bakterienkultur in Eppendorf-Gefäß überführen, den Rest kühl lagern
- in einer Tischzentrifuge 40 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren und den Überstand abnehmen
- 400 µl STET zum Pellet geben und durch Vortexen das Pellet lösen
- 1 min kochen, anschließend in einer Tischzentrifuge 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand zu 400 µl Isopropanol in ein neues Eppendorf-Gefäß schütten und mischen
- zur Fällung in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 70% EtOH waschen
- Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase-H₂O resuspendieren

2.2.3.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation größerer DNA-Mengen erfolgte aus einer 50 ml ü. N. Kultur. Hierfür wurde ein DNA-Präparations-Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH Düsseldorf) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.11 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen (Qiagen GmbH Düsseldorf) gemäß der Protokollangaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden ca. 50-100 Fliegen eingesetzt.

2.2.3.12 Restriktion genomischer DNA für Southern-Blot Analysen

Für Southern-Blot Analysen wurden ca. 1-2 µg genomischer DNA mit 40 Units Restriktionsenzym für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. 1/10 des Ansatzes wurde gelelektrophoretisch auf Vollständigkeit der Restriktion überprüft.

2.2.3.13 Southern-Transfer von DNA auf einen Nylonfilter

Die Gelelektrophorese wurde bei niedriger Spannung (40-60 V) durchgeführt, um eine möglichst gleichmäßige Auftrennung der Fragmente zu erreichen.

- Depurinierung des Gels in 0,25 M HCl für 20 min
- Inkubation des Gels in 0,5 N NaOH für 30 min
- Kapillarer Transfer der DNA auf Nylonfilter *Hybond N⁺* (Amersham) in 0,5 N NaOH ü.N.
- Neutralisieren des Filters durch Waschen in 2 x SSC und 0,1 M Tris pH 7,5 für 10 min
- Filter trocknen lassen und die DNA-Fragmente mittels 120 mJ/cm² UV-Licht kovalent an die Membran binden ($\lambda = 254$ nm).

2.2.3.14 Fluorescein-Markierung von DNA-Sonden

Zur Herstellung Fluorescein-markierter DNA-Sonden für Hybridisierungen wurde das *Gene Images random primer labelling module* (Amersham Buchler, Braunschweig) gemäß Herstellerangaben verwendet. Für die Reaktion wurden ca. 150-200 ng der entsprechenden DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.15 Hybridisierung und Nachweisreaktion (Southern Blot)

Für die Nachweisreaktionen wurde das Gene Images *CDP-Star detection module* (Amersham Buchler, Braunschweig) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

- Vorhybridisierung des Filters in Church-Hybridisierlösung für 30 min bei 65°C
- die markierte Probe für 1 min aufkochen und zum Filter geben
- Inkubation bei 65°C ü. N.
- Entfernung der Hybridisierlösung inkl. Sonde (Lagerung bei -20°C)
- 2 x 10 min bei 65°C mit Church-Waschlösung waschen
- 1 h in 10% Blocklösung/Puffer A waschen
- Inkubieren des Blots für 1-2 h in Puffer A mit 0,5% Rinder-Serum und 1:5000 Anti-Fluorescein-AP Antikörper
- 3 x 10 min in 0,3% Tween 20 in Puffer A waschen
- Filter leicht antrocknen lassen und Zugabe der CDP-Nachweis-Reagenz
- Filter in Klarsichtfolie wickeln und in einer Filmkassette mit Röntgenfilm für 30 sec bis 1 h exponieren
- den Film nach Herstellerangaben entwickeln

2.2.3.15 PCR

Alle Amplifikationen wurden auf einem MJ Research PTC 200 DNA-Engine (Biozym) durchgeführt.

2.2.3.15.1 Standard PCR

Für Standard PCR-Amplifikationen wurde entweder genomische DNA nach konventioneller Aufreinigung (2.2.3.11) oder aus Einzelfliegen-Präparationen (2.2.3.15.2) eingesetzt.

Für die Amplifikation wurde folgender Reaktionsansatz (50 µl) angesetzt:

Template	ca. 0,1 mg/ml	1 µl
10 x Puffer	1x	5 µl
dNTP	0,2 mM	1 µl
steriles H ₂ O	ad 50 µl	32 µl
Primer A (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Primer B (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	1U	0,2 µl

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

Standard-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C	3:00 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
Annealing (je nach Primerpaar)	60 °C (variabel)	0:15 min
Extension	72 °C	2:30 min (variabel)
Wiederholung der Schritte 2-4		30x
finale Extension	72 °C	10:00 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

2.2.3.15.2 Isolierung genomischer DNA aus Einzelfliegen für die PCR

- Betäubung einer Fliege in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß
- Zerstoßen mit einer Pipettenspitze in der sich 50 µl SquiB und 200 µg/ml Proteinase K befinden, anschließend alles gut vermischen
- Inkubation bei 37°C für 30 min
- Inaktivierung der Proteinase K durch Inkubation bei 85°C für 2 min (Standard-PCR) oder durch Zugabe von 1 µl 0,1 M PMSF (Einzelfliegen-Inverse PCR)
- Für die Standard-PCR werden 2 µl als DNA-Template eingesetzt.

2.2.3.15.3 Inverse-PCR

Mit der Inversen PCR lassen sich unbekannte DNA-Sequenzen amplifizieren, wenn die Sequenz der flankierenden Region, wie z. B. bei einer P-Element Insertion bekannt ist. Die genomische DNA wird mit einem häufig schneidenden Enzym restringiert und anschließend in starker Verdünnung ligiert, so dass monomere zirkuläre Moleküle entstehen. Die Ligationsreaktion wird als Template in einer PCR eingesetzt. Die Primer innerhalb der bekannten Region (Inverted Repeat des P-Elements) werden so gewählt, dass sie mit ihren 5' Enden aufeinander weisen. Im resultierenden PCR-Produkt wird das unbekannte DNA-Fragment an beiden Enden von bekannten Sequenzen flankiert und kann so direkt sequenziert werden.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein Protokoll für Einzelfliegen Inverse-PCR verwendet (modifiziert nach Gloor et al., 1993).

2.2.3.15.4 Einzelfliegen Inverse-PCR

- Betäubung einer Fliege in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß
- Zerstoßen mit einer Pipettenspitze in der sich 50 µl SquiB und 200 µg/ml Proteinase K befinden, anschließend alles gut vermischen
- Inkubation bei 37°C für 30 min
- Inaktivierung der Proteinase K durch Zugabe von 1µl 100mM PMSF und Inkubation für 15 min 65°C
- 8 µl der DNA in 20 µl mit geeignetem Restriktionsenzym (z. B.: *CfoI*, *MspI*, *RsaI*, *NdeII*) bei 37°C für 20 min restringieren
- Inaktivierung des Restriktionsenzym durch Inkubation für 15 min bei 65°C
- 6 µl der restringierten DNA in 10 µl ligieren (1 Unit T4 DNA-Ligase, Promega)
- Inkubation für 60 min bei 22°C
- Denaturieren der DNA durch Erhitzen auf 95°C für 2 min, bei 4°C lagern.
- 10 µl für die Inverse PCR einsetzen (50 µl Ansatz)

Für die Inverse PCR wurde der gleiche Reaktionsansatz wie für die Standard PCR eingesetzt. Für die Amplifizierung flankierender Sequenzen von P-Elementen wurden die Primer Pry1 und Pry2 eingesetzt (BDGP).

Inverse PCR-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C	3:00 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
Annealing	60 °C	0:30 min
Extension	72 °C	3:30 min
Wiederholung der Schritte 2-4		34x
finale Extension	72 °C	10:00 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

2.2.3.16 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem Amersham Sequenzierungs-Kit (*Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem ABIPRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt). Zur Analyse der Sequenzdaten wurde das Programm *Lasergene DNASTAR Software Package* (GATC, Konstanz) verwendet.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Zu der Proteinlösung (2-5 μ l) wurde Bradford-Reagenz (1:4 mit ddH₂O verdünnt) hinzugegeben (ad 1 ml). Nach Inkubation für 10 min wurde die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm in Kunststoffküvetten in einem Photometer (Eppendorff) gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine entsprechende Eichgerade mit definierten Konzentrationen BSA als Standard erstellt.

2.2.4.2 Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE). Es wurden Gelelektrophorese-Apparaturen der Firma Hoefer (San Francisco) verwendet. Für die analytischen Gele wurden SE 260 Minikammern und für präparative Gele SE 600 Kammern verwendet.

Nach dem Polymerisationsstart der Trenngellösung durch Zugabe von APS und TEMED wurde das Trenngel bis auf ca. 2/3 der Gesamthöhe der Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (1 h) wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel (nach Polymerisationsstart) überschichtet. In das noch flüssige Gel wird der Probenkamm eingesetzt. Vor der Verwendung muß das Sammelgel vollständig polymerisiert sein.

Die Elektrophorese erfolgt bei analytischen Gelen für 1 h bei 20 mA und bei präparativen Gelen für 5 h bei 30 mA.

Die Gele wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt oder für eine immunhistochemische Analyse nach einem Western Blot eingesetzt.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine erfolgte durch einen Vergleich mit Standardmarkern.

2.2.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen

Der Proteintransfer nach SDS-PAGE auf PVDF-Membranen (Amersham) erfolgte in einer Tank-Blot Einheit der Firma Hoefer (San Francisco) nach Angaben des Herstellers.

Material und Methoden

Die PVDF-Membran wurde für 10 sec in Methanol aktiviert, 5 min in ddH₂O gewaschen und für 5 min im Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA/cm².

Die Membran wurde für 1 h in 10% Milchpulver/TBS-Tween 20 geblockt. Der primäre Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung hinzugegeben und ü. N. bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch 5 x 20 min waschen mit TBS von der Membran entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur und erneutes Waschen für 5 x 20 min mit TBS-Tween 20.

Für den Nachweis des Antigens wurde das ECL-Western-Blotting Detektiersystem (Amersham) verwendet.

2.2.4.4 Expression von GST-Fusionsproteinen

Die GST-Fusionskonstrukte (pGEX-T4 + Insert) wurden durch Transformation in BL21-Zellen eingebracht.

Für analytische Gele wurden 2 ml Kulturen angeimpft (2 x YT-Medium).

- Inkubation für 3-4 h bei 37°C im Schüttler
- Induktion der GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8
- weitere Inkubation für 4 h bei 30°C im Schüttler
- zentrifugieren der Kultur bei 13.000 rpm für 1 min in einem 2 ml Reaktionsgefäß
- aufnehmen des Pellets in 250 µl
- 50 µl 1:1 mit 2 x SDS Probenpuffer versetzen, für 5 min bei 100°C inkubieren
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren und per SDS-PAGE testen

Für präparative Gele und zum Test der Löslichkeit wurde eine 500 ml Kultur eingesetzt. Die Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und das Pellet in BLB-Puffer aufgenommen (5 ml/g Feuchtgewicht).

- Zellaufschluß mit Sonifiziergerät (Amplitude 100 W, Frequenz 1 Hz)
- zentrifugieren für 30 min bei 15.000 rpm (JA20 Rotor, Beckman)
- Pellet in gleichem Volumen aufnehmen
- Überstand und Pellet per SDS-Page testen (20 µg auf analytischem Gel).

2.2.4.5 Elution von GST-Fusionsproteinen

Für die Immunisierungen mussten die unlöslichen Proteine in einem präparativen SDS-PAGE Gel aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten werden. Hierfür wurde die Proteine innerhalb des präparativen Gels durch eine wässrige Coomassie-Lösung angefärbt. Anhand eines *prestained* Molekulargewichtsmarkers (Amersham) konnte die richtige Proteinbande ausgeschnitten werden. Ein Aliquot der Bande wurde erneut durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot und anschließender immunhistochemischer Analyse auf Richtigkeit überprüft.

2.2.5 Zellkultur Methoden

Für die Zellkultur Experimente wurden *Drosophila* Schneider 2 (S2) Zellen (Invitrogen) verwendet.

2.2.5.1 Kultivierung der *Drosophila* Schneider 2 Zellen

Die Zellen wurden in Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen) (10 ml) mit 10% hitze-inaktiviertem FBS und 50 Units Penicillin G und 50 Units Streptomycin Sulfat pro ml bei 25°C kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 6×10^6 bis 20×10^6 in einem Verhältnis von 1:5 in eine neue Kulturflasche passagiert.

2.2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Dazu wurden die Zellen der 4 Gruppenquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet (VF: Verdünnungsfaktor; Fläche eines Gruppenquadrates: $0,04 \text{ mm}^2$; Kammertiefe: $0,1 \text{ mm}$ → Volumen: $0,004 \text{ }\mu\text{l}$):

Mittelwert der 4 Quadrate \times VF $\times 10^4 =$ Zellzahl/ml

Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen an Zellen wurde zentrifugiert und das Sediment in der zur Einstellung des Titers erforderlichen Menge an Medium resuspendiert.

2.2.5.3 Antikörperfärbung an *Drosophila* Schneider S2 Zellen

Zur Förderung der Adhärenz der S2 Zellen wurden Deckgläser vor der Verwendung mit Fibronectin (1:100 in PBS) beschichtet. In einer 24-well Platte wurden 1×10^6 S2 Zellen auf den beschichteten Deckgläschen ausgesät.

- die Zellen werden ü. N. bei 25°C kultiviert
- am nächsten Tag das Medium vorsichtig abnehmen

Material und Methoden

- Zellen 2 x mit PBS (pH7,2) waschen
- für 15 min bei RT in 4% Paraformaldehyd/PBS fixieren (1 ml/well)
- 1 x 5 min mit PBS waschen
- Permeabilisierung der Zellen für 3 min mit 0,5% Triton X-100/PBS (1 ml/well)
- 1 x mit PBS waschen
- Blocken in 3% BSA/PBS für 1 h
- 2 x 5 min mit PBS waschen
- Inkubation des primären Antikörpers für 2 h bei RT (300µl/well)
- 2 x 5 min mit PBS waschen
- Inkubation des sekundären Antikörpers für 1 h bei RT (300µl/well)
- 3 x 5 min mit PBS waschen
- Deckgläschen 1 x mit H₂O waschen und umgekehrt in entsprechendes Medium auf einem Objektträger einbetten.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Neuron-Glia Interaktionen während der Embryogenese von *Drosophila melanogaster*. Im Mittelpunkt stand die phänotypische und molekulare Charakterisierung von drei Mutationen, die nach einer EMS-Mutagenese aufgrund ihres fusionierten Kommissurenphänotyps isoliert wurden: *klötzchen*, *kästchen* und *schmalspur* (Hummel et al., 1999a).

3.1 Darstellung der Neuron-Glia Interaktionen im Wildtyp

Die enge Interaktion von Neuronen und Gliazellen ist entscheidend für die Entwicklung und Funktion aller höheren Nervensysteme. Zur Analyse der molekularen Mechanismen, die sowohl innerhalb der Neurone und Gliazellen als auch an der direkten Zell-Zell Interaktion zwischen beiden Zelltypen beteiligt sind, benötigt man ein gut charakterisiertes Modellsystem. Die ventrale Mittellinie des zentralen Nervensystems (ZNS) des *Drosophila* Embryos ermöglicht die detaillierte Charakterisierung dieser Prozesse.

Während der Entwicklung des ZNS werden die anteriore und posteriore Kommissur in direkter Nachbarschaft angelegt und erst später durch eine interkalierende Migration der Mittelliniengliazellen getrennt (Abb. I, Klämbt et al., 1991). Die Interaktion der Mittellinien-Neurone (ML-Neurone) und Mittellinien-Gliazellen (ML-Gliazellen) wurde zunächst im Wildtyp mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems und konfokaler Mikroskopie analysiert. Hierzu wurde das Transmembranprotein CD2 mit Hilfe der Treiberlinie *slit*-GAL4 ektopisch in den ML-Gliazellen exprimiert. Die gleichzeitige Markierung der Zellkörper und axonalen Fortsätze aller Neurone ermöglichte die Darstellung der Neuron-Glia Interaktion in sehr präziser Auflösung.

Abbildung 1 zeigt die enge Interaktion der beiden Zelltypen nach der Trennung der Kommissuren am Ende der Embryogenese (die jüngeren Stadien sind in Abbildung 3 dargestellt). In Abb. 1 A und B ist eine laterale Ansicht der ventralen Mittellinie dargestellt. Die ML-Gliazellen haben die beiden Kommissuren deutlich voneinander getrennt und umhüllen sie vollständig mit ihren basalen Zellausläufern. In der Ausschnittsvergrößerung sind die axonalen Projektionen der ML-Neurone, die von ventral über die posteriore Kommissur zur anterioren Kommissur verlaufen (Pfeile in Abb. 1 B), deutlich zu erkennen. Während der Entwicklung des Nervensystems dienen diese axonalen Projektionen den ML-Gliazellen als Substrat für die Migration zwischen die beiden Kommissuren. Die ML-

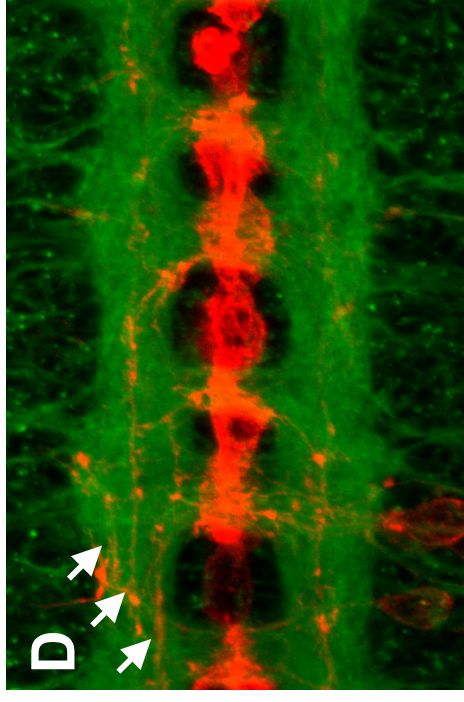
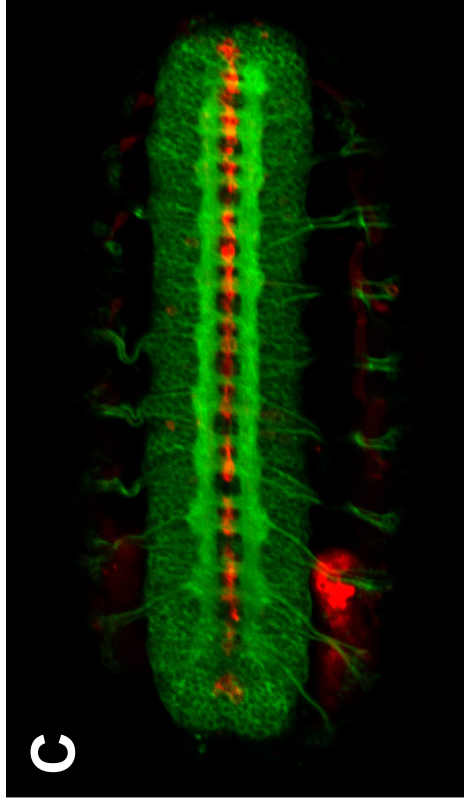
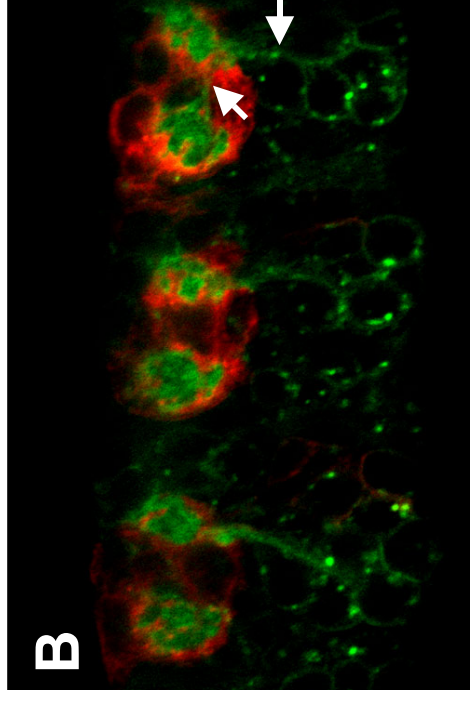
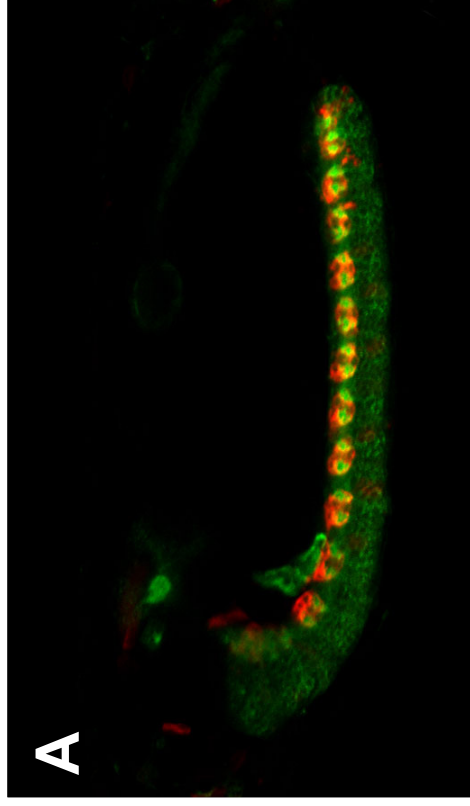


Abb.1 Neuron-Glia Interaktionen in der ventralen Mittellinie des ZNS. Die Zellmembranen der Mittelliniengliazellen sind rot markiert (*slt-GAL4/UAS-CD2*, anti-CD2) und alle Neurone grün (anti-HRP). (A, B) Laterale Ansicht (eine Fokusebene) der ventralen Mittellinie eines wildtypischen Embryos am Ende der Embryogenese. Die Vergrößerung (B) zeigt, dass die Mittelliniengliazellen die Kommissuren umhüllen und in einzelne Faserbündel unterteilen. Die axonalen Projektionen der VUM-Neurone, die als Substrat für die gliale Migration dienen, sind deutlich zu erkennen (Pfeile in B). (C, D) Ventralen Ansicht (Projektionen konfokaler Bildstapel, 20 μm in 0,5 μm Schritten) des ZNS. In der Vergrößerung (D) ist zu erkennen, dass die Mittelliniengliazellen nicht nur die Kommissuren umhüllen, sondern über lange Zellausläufer auch direkt mit den longitudinalen Axonen interagieren (Pfeile in D).

Ergebnisse

Gliazellen sind sowohl für die Trennung der Kommissuren als auch für die Isolierung der Axone gegen die umgebende Hämolymphe verantwortlich. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ML-Gliazellen die Axone der Kommissuren als Ganzes umhüllen und zugleich in drei distinkte Axonbündel gliedern (Abb. 1 B). Diese Daten bestätigen die Befunde der elektronenmikroskopischen Analysen (Stollewerk and Klämbt, 1997).

Für die Darstellung der ventralen Ansicht des ZNS wurden die Projektionen mehrerer konfokaler Fokusebenen verwendet (Abb. 1 C, D). Die Übersichtsansicht (Abb. 1 C) zeigt, dass die zellulären Ausläufer der ML-Gliazellen die Kommissuren komplett umhüllen und entlang der gesamten Mittellinie zu finden sind. In der Ausschnittsvergrößerung (Abb. 1 D) wird deutlich, dass die ML-Gliazellen nicht nur die Kommissuren mit ihren basalen Zellfortsätzen umhüllen, sondern auch Zellausläufer in die Konnektive aussenden (Pfeile in Abb. 1 D). Die Zellausläufer sind in bis zu drei Bahnen innerhalb der Konnektive detektierbar, die möglicherweise dem Verlauf der Fasciclin II-exprimierenden Axonbündeln entsprechen. Zusätzlich findet man lange gliale Ausläufer, die dem Segmental- und Intersegmentalnerv in das periphere Nervensystem folgen (Daten nicht gezeigt). Die ML-Gliazellen treten somit mit vielen verschiedenen axonalen Kompartimenten in direkten Kontakt. Eine Funktion dieser Interaktion mit den Axonen der Konnektive ist unbekannt. Die ML-Gliazellen könnten aber an der Sortierung der Axone in die unterschiedlichen Faszikel innerhalb der Konnektive beteiligt sein.

Kommt es zu einer Störung der engen Interaktion von ML-Gliazellen und ML-Neuronen, werden die Kommissuren nicht mehr vollständig getrennt und ein sogenannter fusionierter Kommissurenphänotyp ist zu beobachten (Klämbt et al., 1991; Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b).

3.2 Analyse des Gens *klötzchen*

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von *klötzchen*

3.2.1.1 Analyse des fusionierten Kommissurenphänotyps

Die *klötzchen* (*klo*) Komplementationsgruppe setzt sich aus 4 Allelen zusammen, von denen 2 möglicherweise klonal sind (klo^{E2-26} und klo^{E2-66}). Alle Mutationen führen zu einer Fusion der Kommissuren und einer leichten Reduktion der Konnektive. Der Phänotyp ist am stärksten ausgeprägt bei der Mutation klo^{E2-26} (bzw. klo^{E2-66}), hier kommt es stellenweise zu

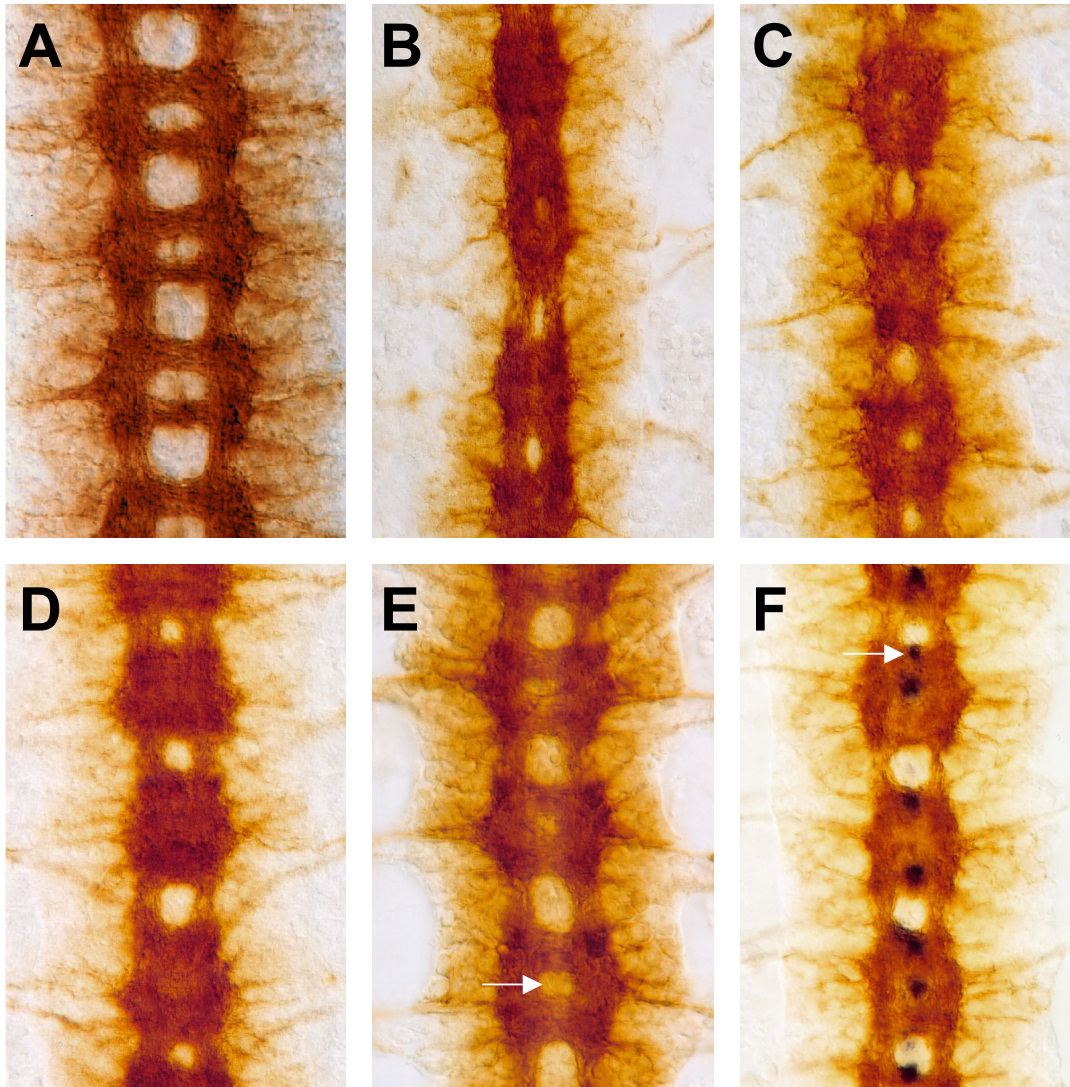


Abb. 2 Der *klötzchen* ZNS-Phänotyp. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. Markierung der Mittellinien-Gliazellen mit Hilfe der Enhancer-Trap Insertion *AA142* (F). (A) Wildtyp; (B) *klo^{E2-26}*; (C) *klo^{E2-66}*; (D) *klo^{D4-65}*; (E) *klo^{N2-141}*; (F) *klo^{E2-26}AA142*. Die *klötzchen* Mutationen führen zu einer Fusion der Kommissuren und einer leichten Reduktion der Konnektive. Bei *klo^{E2-26}* mutanten Embryonen kommt es stellenweise zu einem Kollaps der Axone an der ventralen Mittellinie (B). Die Reduktion der Konnektive und die vollständige Fusion der Kommissuren ist besonders gut bei *klo^{D4-65}* zu erkennen (D). Bei dem schwachen *klötzchen* EMS-Allel *klo^{N2-141}* sind immer noch axonfreie Bereiche zwischen der anterioren und posterioren Kommissur zu detektieren (E, Pfeil). Zur Analyse des Verhaltens der ML-Gliazellen wurde die Enhancer-Trap Insertion *AA142* auf das Chromosom *klo^{E2-26}* rekombiniert. Es kommt zu einer Reduktion der Anzahl der ML-Gliazellen. Die Zellkerne der verbleibenden ML-Gliazellen sind zum Teil falsch positioniert (F, Pfeil).

Ergebnisse

einem Kollaps des ZNS an der ventralen Mittellinie. *klo*^{D4-65} mutante Embryonen zeigen einen starken fusionierten Kommissurenphänotyp und die Konnektive sind deutlich reduziert. Bei dem schwächsten Allel *klo*^{N2-141} sind noch axonfreie Bereiche zwischen den Kommissuren zu erkennen (Abb. 2 B-E).

Um das Verhalten der ML-Gliazellen in *klötzchen* mutanten Embryonen analysieren zu können, wurde die Enhancer-Trap Insertion P[w⁺, lacZ]AA142 auf das Chromosom *klo*^{E2-26} rekombiniert. Die Insertion AA142 führt zu einer Expression von β-Galactosidase im Zellkern aller ML-Gliazellen. In *klötzchen* mutanten Embryonen ist die Anzahl der ML-Gliazellen am Ende der Embryogenese reduziert (1-2 Gliazellen anstelle von 3-4 im Wildtyp) und die verbleibenden ML-Gliazellen sind oft fehlpositioniert (Pfeil in Abb. 2 F). Da auch die Doppelmutanten-Analyse mit *orthodenticle*, als neuronal benötigtes Gen, und mit *pointed*, als glial benötigtes Gen, eine Funktion von *klötzchen* innerhalb der ML-Gliazellen nahelegte (Hummel et al., 1999b), wurde das Verhalten der ML-Gliazellen mit Hilfe des *slit*-GAL4/UAS-CD2 Systems genauer untersucht.

Im Wildtyp beginnen die ML-Gliazellen in Stadium 10 aus dem epithelialen Mesektoderm in das Innere des Embryos zu delaminieren. Die langen apikalen Fortsätze der ML-Gliazellen, die im Epithel verbleiben, sind gut zu erkennen (Abb. 3 A, Pfeil). *klötzchen* mutante Embryonen zeigen erste Defekte schon in diesem frühen Entwicklungsstadium. Die ML-Gliazellen delaminieren zwar normal, die apikalen Zellausläufer verbleiben jedoch nicht innerhalb des mesektodermalen Epithels, sondern werden zu früh zurückgezogen (Pfeil in Abb. 3 B). In Embryonen des Stadiums 14/15 migrieren die ML-Gliazellen entlang der axonalen Fortsätze der VUM-Neurone zwischen die beiden Kommissuren und beginnen die Kommissuren mit ihren basalen Zellfortsätzen zu umhüllen (Abb. 3 C). In *klötzchen* mutanten Embryonen ist die Zellform der ML-Gliazellen verändert und die Zellen sind wesentlich kleiner. Die Zellfortsätze sind deutlich kürzer und umhüllen die Kommissuren nur unvollständig (Abb. 3 D). Am Ende der Embryogenese sind die Kommissuren im Wildtyp vollständig getrennt und von ML-Gliazellen umhüllt (Abb. 3 E und Abb. 1 A, B). Hier werden die Unterschiede zwischen *klötzchen* mutanten Embryonen und dem Wildtyp besonders deutlich. Die Gliazellen sind nicht in der Lage, die anteriore und posteriore Kommissur voneinander zu trennen. Die Axone werden nur unvollständig umhüllt und die ML-Gliazellen sind in ihrer Form stark verändert gegenüber dem Wildtyp. Zugleich ist die Anzahl der ML-Gliazellen reduziert. Die Hauptursache für den fusionierten Kommissurenphänotyp scheint folglich die defekte Morphologie der ML-Gliazellen zu sein. Grund hierfür

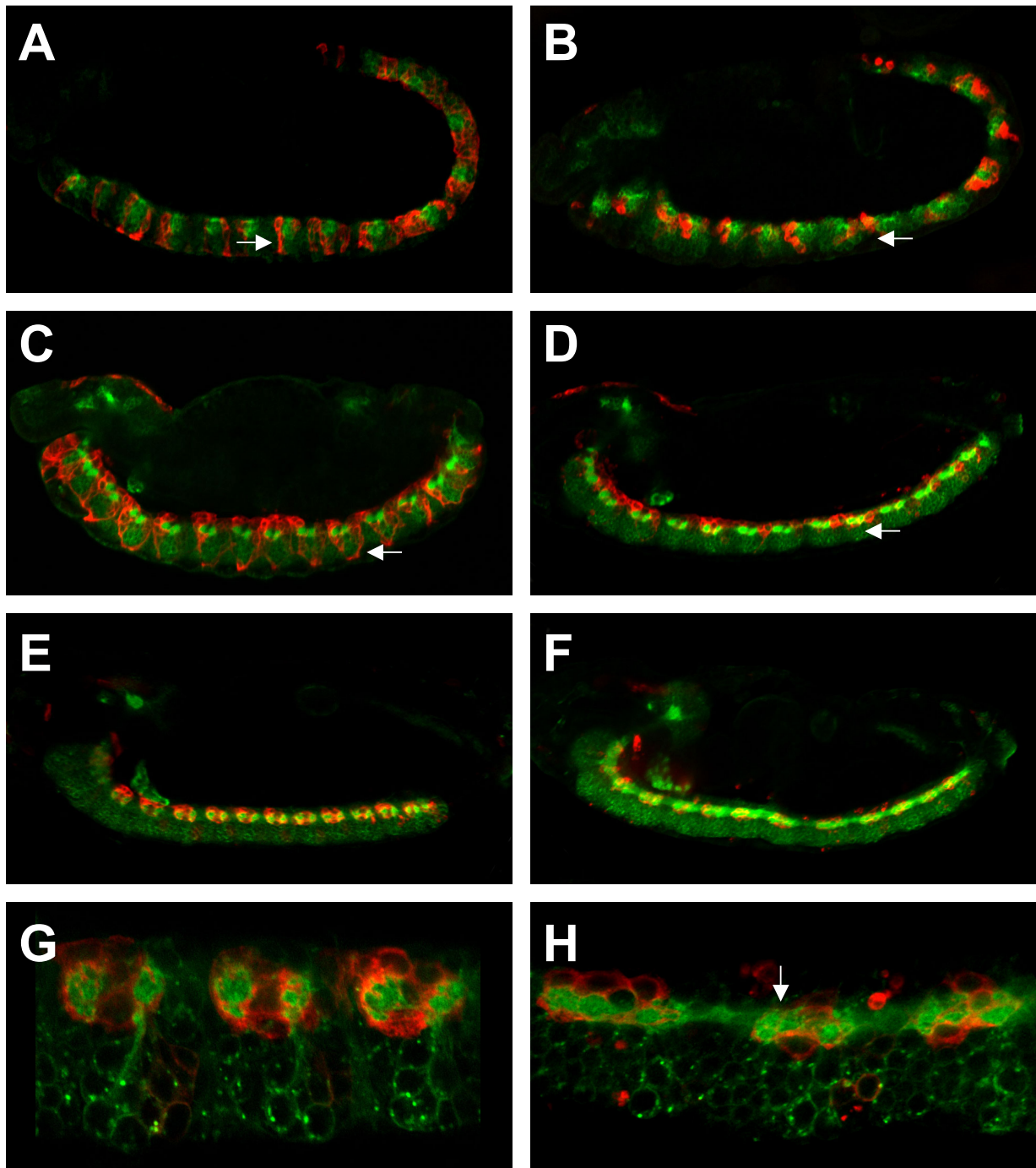


Abb. 3 Das Verhalten der ML-Gliazellen in *klötzchen* mutanten Embryonen. Die Zellmembranen der ML-Gliazellen sind rot markiert (*sli-GAL4/UAS-CD2*, anti-CD2) und alle Neurone grün (anti-HRP). Laterale Ansichten der ventralen Mittellinie zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. (A, C, E, G) Wildtyp; (B, D, F, H) *klo^{E2-26}/Df(3L)Aprt³²*. Das Verhalten der ML-Gliazellen wurde an transheterozygoten Embryonen des *klötzchen* EMS-Allels *klo^{E2-26}* über der Defizienz *Df(3L)Aprt³²* analysiert, um genetische Hintergrundeffekte ausschließen zu können. Schon in frühen Entwicklungsstadien (Stadium 12) kommt es zu Defekten der ML-Gliazellen. Die apikalen Zellausläufer werden deutlich früher als im Wildtyp zurückgezogen (Vergleiche A und B, Pfeile). Während der gesamten Embryogenese sind die Zellausläufer der ML-Gliazellen in *klötzchen* mutanten Embryonen kürzer als im Wildtyp (Stadium 14 C, D, Pfeile) und die ML-Gliazellen sind nicht in der Lage die Kommissuren zu umhüllen und voneinander zu trennen (H, Pfeil).

Ergebnisse

sind möglicherweise Probleme bei der Regulation des Zytoskeletts, da besonders die langen zellulären Ausläufer der ML-Gliazellen in *klötzchen* mutanten Embryonen betroffen sind.

Der *klötzchen* ZNS-Phänotyp kann aber nicht ausschließlich durch eine Störung der Migration der ML-Gliazellen zustande kommen, da auch die Konnektive in *klötzchen* mutanten Embryonen Defekte zeigen. Zu einer genaueren Beurteilung des Phänotyps wurden die lateralen Gliazellen und ein Teil der ZNS-Neurone mit in die Analyse einbezogen. Während im Wildtyp die einzelnen 22C10-positiven Axone gebündelt und symmetrisch angeordnet sind, findet man in *klötzchen* mutanten Embryonen Defekte in der Projektion und Faszikulation der Axone (Abb. 4 E, H). Auch die axonalen Projektionen der VUM-Neurone, die als Substrat für die Migration der ML-Gliazellen dienen, sind betroffen (Abb. 4 H, Pfeil). Interessanterweise kommt es in *klötzchen* mutanten Embryonen zur Ausbildung von zusätzlichen 22C10-positiven Zellen dorsal der Axonbahnen des ZNS (Abb. 4 F, Pfeil). Diese 22C10-positiven Zellen sind keine Gliazellen, wie die Doppelfärbung mit dem Gliaspezifischen Antikörper anti-Repo zeigt (Abb. 4 H, I).

Die Analyse der lateralen Gliazellen mit dem anti-Repo Antikörper zeigte, dass die Gliazellen nicht in einem regelmäßigen Muster wie im Wildtyp vorliegen (Vergleiche Abb. A-C). Die lateralen Gliazellen zeigen jedoch keine auffälligen Migrationsdefekte. In der Doppelfärbung der Gliazellen und 22C10-positiven Neurone wird deutlich, dass sich die lateralen Gliazellen immer in direktem Kontakt mit den Axonen des ZNS befinden. Die beobachtete leichte Fehlverteilung scheint somit ein sekundärer Effekt zu sein, da die Gliazellen auf neuronalen Kontakt angewiesen sind (Booth et al., 2000). Es ist jedoch eine starke Defaszikulation der Axone zu erkennen, die auf eine unzureichende Umhüllung der Faszikel durch die lateralen Gliazellen schließen lässt (Abb. 4 H). Die lateralen Gliazellen scheinen, analog zum Phänotyp der ML-Gliazellen, nicht in der Lage zu sein, die Konnektive zu ausreichend zu bündeln. Die Faszikulationsdefekte der Axone konnten auch mit einem anti-Fasciilin II Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.1 Analyse des peripheren Nervensystems und der somatischen Muskulatur

Mutationen, die zu Störungen der Entwicklung des zentralen Nervensystems führen, betreffen häufig auch die Entwicklung des peripheren Nervensystems (PNS). Zugleich lassen sich hier generelle Defekte der axonalen Projektion genauer analysieren als im ZNS. Hierfür eignet sich besonders gut das stereotype Projektionsmuster der Fasciilin II-positiven Motoneurone. Zur Unterscheidung, ob mögliche Projektionsdefekte durch Fehler bei der

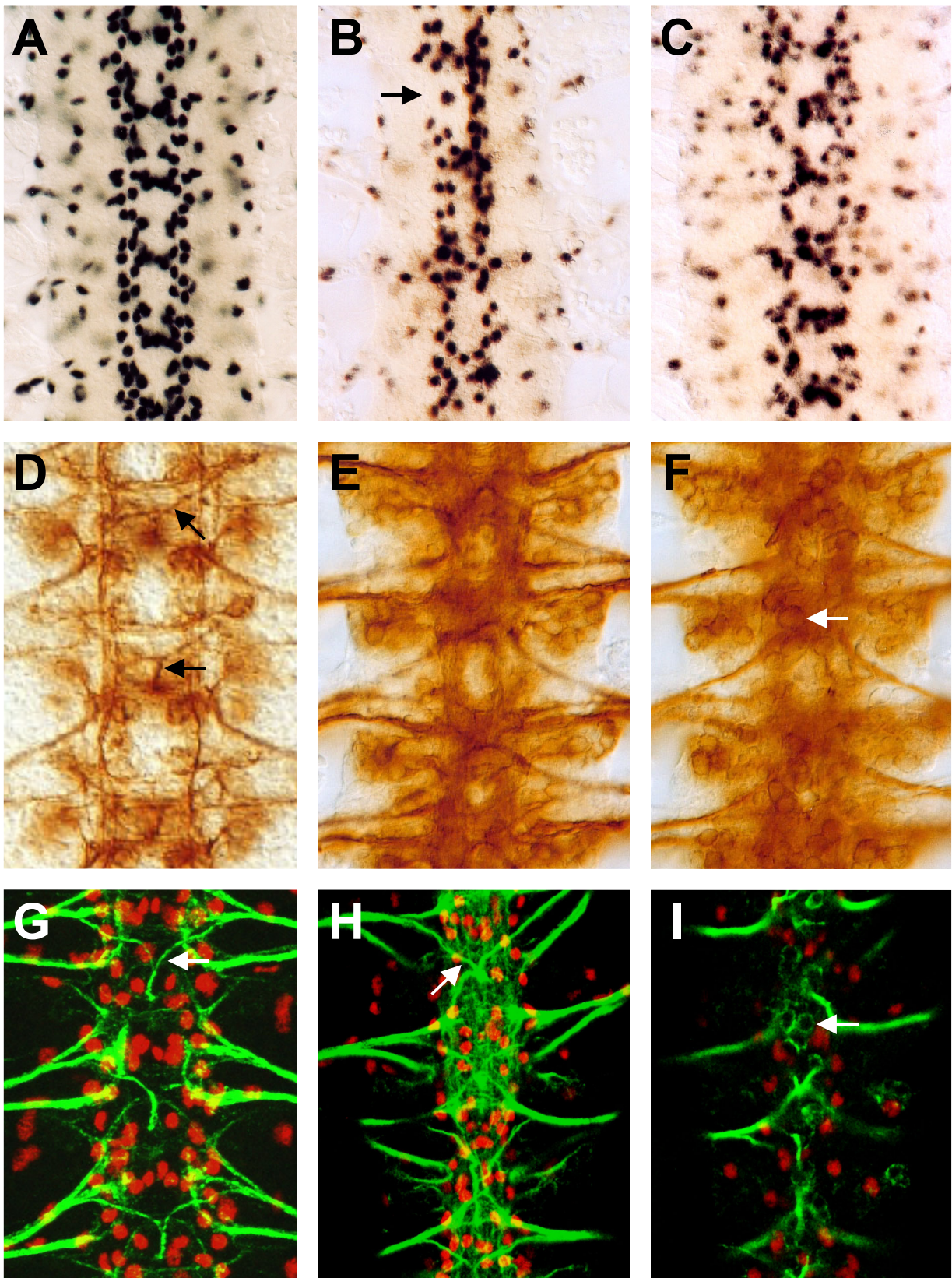


Abb. 4 Analyse der VUM-Neurone und der lateralen Gliazellen. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Die Verteilung der lateralen Gliazellen wurde mit dem mAb anti-Repo (rot in G-I) und die Projektionen der VUM-Neurone mit dem mAb 22C10 (grün in G-I) analysiert. (A, D, G) Wildtyp; (B) *klo^{E2-26}*; (C) *klo^{D4-65}*; (E-F, H-I) zwei Fokusebenen von *klo^{E2-26}/klo^{D4-65}* Embryonen. In *klötzchen* mutanten Embryonen kommt es zu leichten Defekten der Projektionen der VUM-Neurone (H, Pfeil) und der Wanderung der lateralen Gliazellen (B, Pfeil). Es kommt zu starken Faszikulationsdefekten (Vergleiche G, H). Die 22C10-positiven Zellen in den dorsalen Bereichen des ZNS (F, Pfeil) sind keine Gliazellen (I, Pfeil).

Ergebnisse

axonalen Wegfindung oder durch Defekte im Zielgebiet, der somatischen Muskulatur, zustande kommen, wurde eine gleichzeitige, konfokale Analyse beider Zelltypen durchgeführt.

Im Wildtyp findet man am Ende der Embryogenese ein komplexes, sehr stereotypes Zusammenspiel der somatischen Muskulatur und der innervierenden Motoneurone. Die verschiedenen Motoneurone innervieren spezifisch ihre Zielzellen und bilden während der Entwicklung immer stärkere neuromuskuläre Verbindungen aus (Abb. 5 A, B). In *klötzchen* mutanten Embryonen findet man in Korrelation zur Ausprägung der ZNS-Phänotypen der einzelnen Mutationen unterschiedlich starke Muskel- und Motoneuronphänotypen. Bei der Mutation *klo*^{E2-26} kommt es zum Verlust eines Großteils der somatischen Muskulatur. Hieraus resultiert ein starker Phänotyp bei der Projektion der Motoneurone; der Verlust der Zielzellen führt zu fehlerhaften Projektionen der Axone, die oft über Segmentgrenzen hinweg wachsen (Abb. 5 C, D). Auch *klo*^{D4-65} mutante Embryonen zeigen einen Verlust einer relativ großen Anzahl von Muskeln, während bei *klo*^{N2-141} weniger Muskeln betroffen sind. Dementsprechend kommt es auch zu immer geringeren Defekten bei der Ausbildung der axonalen Projektionen der Motoneurone. Allerdings findet man auch in *klo*^{D4-65} mutanten Embryonen noch Fehlprojektionen in benachbarte Segmente (Abb. 5 E, F).

Der Muskelphänotyp von *klötzchen* ähnelt dem Phänotyp von Mutationen in Genen, die an der Fusion von Muskelzellen beteiligt sind. Um die Ursache des *klötzchen* Phänotyps genauer bestimmen zu können, wurde die Enhancer-Trap Linie *rP298* in den Hintergrund der *klötzchen* Mutationen gekreuzt. *rP298* ist eine P-Element Insertion im 5'-Bereich des *dumbfounded* Gens und spiegelt das Expressionsmuster des Gens, dass in den Muskel-Gründer Zellen exprimiert wird, wider (Ruiz-Gomez et al., 2000). In *klötzchen* mutanten Embryonen sind die Muskel-Gründer Zellen zwar nicht mehr so stereotyp wie im Wildtyp angeordnet, es ist jedoch keine Reduktion der Anzahl der Zellen festzustellen (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte die Analyse von jüngeren *klötzchen* mutanten Embryonen, dass die ursprüngliche Anlage der somatischen Muskulatur nahezu wildtypisch erfolgt.

Ob *klötzchen* an der Fusion der Muskelzellen beteiligt ist oder für die Aufrechterhaltung der Struktur der Muskelzellen benötigt wird, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die beobachteten Fehler der axonalen Projektion der Motoneurone sind hauptsächlich auf die starken Defekte der innerhalb des Zielgebietes der Motoneurone, der somatischen Muskulatur, zurückzuführen. Eine Funktion von *klötzchen* für die axonale Wegfindung kann

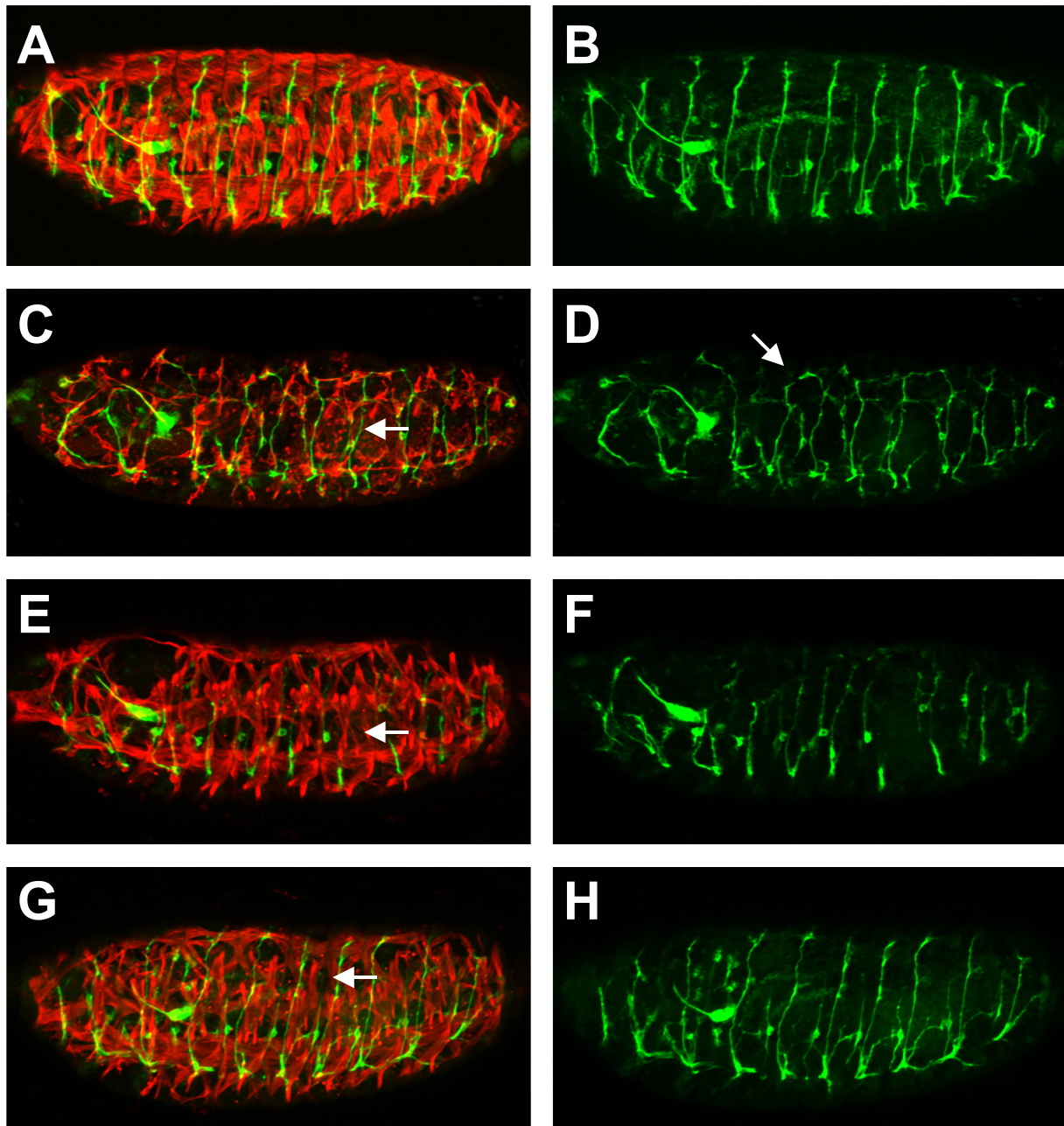


Abb. 5 Muskel- und Motoneuron-Defekte in *klötchen* mutanten Embryonen. Laterale Ansicht von *whole-mount* Embryonen des Stadiums 16. Die somatische Muskulatur wurde mit dem mAb anti- β -Tubulin (rot) und die axonalen Projektionen der Motoneurone mit dem mAb 1D4 analysiert (grün).

(A-B) Wildtyp; (C-D) *klo^{E2-26}*; (E-F) *klo^{D4-65}*; (G-H) *klo^{N2-141}*. In *klötchen* mutanten Embryonen kommt es zu einer starken Beeinträchtigung der Entwicklung der somatischen Muskulatur. In *klo^{E2-26}* mutanten Embryonen sind nur noch vereinzelt Muskelzellen zu erkennen (C, Pfeil). Aufgrund der fehlenden Zielzellen kommt es zu einer starken Fehlprojektion der Motoneurone über die Segmentgrenzen hinweg (D, Pfeil). In Korrelation mit der Analyse der Nervensystemphänotypen ist der Muskel- und Motoneuron Phänotyp bei *klo^{D4-65}* und *klo^{N2-141}* schwächer ausgeprägt. Es kommt aber immer noch zu einem Verlust vieler Muskeln und die verbleibenden Muskelzellen zeigen eine gestörte Morphologie (E, G, Pfeile). In *klo^{N2-141}* mutanten Embryonen sind kaum noch Fehlprojektionen der Motoneurone zu beobachten (H).

Ergebnisse

aber nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden und muss in anderen Geweben genauer analysiert werden.

Zusätzlich zu den Phänotypen des ZNS, des PNS und der somatischen Muskulatur zeigen *klötzchen* mutante Embryonen einen starken Darmdefekt. Die Konstriktionen des Mitteldarms sind nicht oder nur schwach ausgeprägt, so dass es zu einer Deformierung des Darms kommt. Ob die Ursache hierfür eine fehlerhafte Ausbildung der visceralen Muskulatur ist, wurde nicht näher analysiert, erscheint aber aufgrund des Phänotyps der somatischen Muskulatur wahrscheinlich.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass *klötzchen* mutante Embryonen eine Vielzahl spezifischer, embryonaler Phänotypen zeigen. Die Allele *klo*^{E2-26} und *klo*^{D4-65} führen zu embryonaler Letalität; homozygote *klo*^{N2-141} Tiere sterben sowohl am Ende der Embryogenese als auch während des ersten Larvalstadiums.

3.2.2 Molekulare Charakterisierung von *klötzchen*

3.2.2.1 Meiotische Kartierung der *klötzchen* Letalität

Mit Hilfe von Defizienzchromosomen konnte *klötzchen* in den Bereich 62A10-62B4 kartiert werden (Hummel, 1998). Zur weiteren Eingrenzung der *klötzchen* Letalität wurden meiotische Kartierungen gegen 4 verschiedene P-Elemente der Region 62A10-62B08 durchgeführt. Die Ergebnisse der meiotischen Rekombinationsanalyse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

P-Element Insertion	Verhältnis $w^- : w^+$	Meiotischer Abstand zu <i>klo</i>
<i>EP(3)3673</i>	9 : 922	~ 1,0 cM
<i>EP(3)3486</i>	12 : 1334	~ 0,9 cM
<i>EP(3)0304</i>	n.a.	n.a.
<i>EP(3)3143</i>	6 : 2162	~ 0,25 cM
<i>EP(3)0522</i>	2 : 1451	~ 0,15 cM

Meiotische Kartierung der *klötzchen* Letalität Die P-Elemente sind entsprechend ihrer Position von distal nach proximal auf dem Chromosom 3L angegeben. Die Rekombinationsereignisse konnten anhand der Augenfarbe festgestellt werden. Balancertiere wurden in die Analyse nicht mit einbezogen. cM: centi-Morgan. n.a.: nicht analysierbar (die P-Element Insertion führt nur zu einer sehr schwachen w^+ -Expression).

Hieraus ergibt sich, dass *klötzchen* proximal des P-Elements *EP(3)0522* kartiert. Das entspricht dem zytologischen Bereich 62B08 - 62B10. Ursache für die Diskrepanz zwischen

Ergebnisse

der ursprünglichen Kartierung mit Hilfe der Defizienzchromosomen und der meiotischen Kartierung sind ungenaue bzw. falsche Angaben der Bruchpunkte der verwendeten Defizienzen.

3.2.2.2 Generierung von P-Element induzierten *klötzchen* Allelen

In den Datenbanken des *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP) wurde die genomische Sequenz proximal von *EP(3)0522* auf weitere P-Element Insertionen untersucht. Das *EP(3)3081* kartiert 50 kb proximal von *EP(3)0522* und befindet sich folglich in der Umgebung von *klötzchen*. Die Insertion ist homozygot lebensfähig und komplementiert alle *klötzchen* EMS-Allele. Auch mit diesem P-Element wurde eine meiotische Kartierung durchgeführt, um zu bestätigen, dass sich die Insertion in der direkten Umgebung von *klötzchen* befindet. Es kam, bei 875 analysierten Fliegen, zu keiner Rekombination zwischen *klötzchen* und der P-Element Insertion *EP(3)3081*.

Das *EP(3)3081* ist *white*⁺ markiert und eignet sich zur Durchführung eines „local hop“-Experiments zur Generierung von P-Element induzierten *klötzchen* Allelen. Bei einer „local hop“-Mutagenese wird das P-Element mit Hilfe eines Transposase-Stammes ($\Delta 2-3$) mobilisiert und anschließend werden neue P-Element Insertionen anhand einer Veränderung der Augenfarbe im Vergleich zum Ausgangsstamm identifiziert (heterozygote *EP(3)3081* Tiere haben orange Augen). Die Reintegrationsereignisse eines P-Elements erfolgen bevorzugt in der näheren Umgebung der Ursprunginsertion (Tower et al., 1993).

Es wurden 580 Chromosomen mit einer veränderten Augenfarbe auf Komplementation der *klötzchen* Letalität getestet. 4 neue P-Element induzierte *klötzchen* Allele konnten isoliert werden, *klo*^{P1}-*klo*^{P4}. Der Insertionsort der P-Element induzierten *klötzchen* Allele wurde über Einzelfliegen Inverser PCR analysiert (siehe Material und Methoden). Bei den Allelen *klo*^{P1}, *klo*^{P2} und *klo*^{P4} konnte die angrenzende genomische Sequenz der P-Elemente, und somit der Insertionsort, bestimmt werden. Für *klo*^{P3} ließ sich kein spezifisches PCR-Produkt generieren. Die drei analysierbaren *klötzchen* P-Elemente, *klo*^{P1}, *klo*^{P2} und *klo*^{P4}, inserieren alle innerhalb des ersten Introns von *α -spectrin* (Abb. 6).

3.2.2.3 Die genomische *α -spectrin* Region

Das *Drosophila α -spectrin* Gen wurde 1993 kloniert und phänotypisch charakterisiert (Lee et al., 1993). Mutationen in *α -spectrin* führen zu larvaler Letalität (L1) und zeigen einen charakteristischen Darmphänotyp (Lee et al., 1993). Die *α -spectrin* mRNA ist 8114 bp lang

Ergebnisse

und erstreckt sich über einen genomischen Bereich von ca. 17 kb. Die Analyse der ESTs (Expressed Sequence Tags: die ersten ca. 400 bp des 5' Bereiches von *Drosophila* cDNAs die vom BDGP bestimmt und veröffentlicht werden; www.fruitfly.org) der cDNA-Klone der α -spectrin Region zeigte, dass neben den veröffentlichten α -spectrin cDNAs eine weitere Klasse von cDNA-Klonen existiert. Diese cDNA-Klone teilen sich mit α -spectrin das erste, 100 bp lange, nicht-translatierte Exon, werden dann aber alternativ gespleißt. Das zweite Exon dieser cDNA-Klone liegt innerhalb des ersten Introns von α -spectrin.

Zur Analyse, ob es sich um alternative Transkripte von α -spectrin handelt, oder ob die neue Klasse cDNAs für ein anderes, unabhängiges Protein kodiert, wurden verschiedene cDNA Klone dieser Klasse bestellt (Invitrogen). Die DNA von 5 verschiedenen cDNA Klonen wurde präpariert und die Sequenzen des 5' und 3' Bereiches bestimmt. 3 Klone enthielten keine 3'-Poly-A Sequenz. Hierbei handelt es sich folglich um unvollständige cDNA Klone. Die beiden anderen cDNA-Klone, *LD18420* und *LD29802* wiesen eine Poly-A Sequenz an ihrem 3' Ende auf. Die 3'-Bereiche der cDNAs kartieren in den genomischen Bereich innerhalb des ersten α -spectrin Introns. Die cDNA *LD18420* wurde vollständig sequenziert. Sie ist 3985 bp lang, teilt sich das erste, 100 bp große Exon mit α -spectrin und besitzt nur noch ein weiteres Exon, das komplett innerhalb des ersten Introns von α -spectrin liegt (Abb. 6).

Innerhalb der cDNA konnte ein offener Leseraster (ORF) von 3720 bp nachgewiesen werden, der komplett im zweiten Exon liegt und für ein Protein von 1240 Aminosäuren kodiert. Im Zuge der Veröffentlichung der DNA-Sequenz des *Drosophila* Genoms (Adams et al., 2000) und der gleichzeitigen Analyse und Annotation der Sequenz durch das BDGP wurden diese Daten bestätigt. Das Gen, das der cDNA *LD18420* entspricht, wird unter der Bezeichnung *CG32315* geführt. Mittlerweile sind mehr als 10 cDNA Klone aus verschiedenen cDNA-Bänken (aus Embryonen, Larven und adulten Tieren) identifiziert worden, deren Sequenzen der cDNA *LD18420* entsprechen. Aufgrund der genomischen Organisation können die *klötzchen* P-Elemente sowohl α -spectrin als auch das neue Gen *CG32315* betreffen (Abb. 6).

Die *klötzchen* Region weist weitere genetische Komplexität auf. Bei der Klonierung des Gens *discs lost* (*dlt*), das etwa 5 kb proximal von α -spectrin kartiert, wurde ein P-Element induziertes *discs lost* Allel identifiziert (*dlt*^{595/4}), das ebenfalls im ersten Intron von α -spectrin inseriert ist (Bhat et al., 1999). Das P-Element *dlt*^{595/4} kartiert zwischen die *klötzchen* Allele

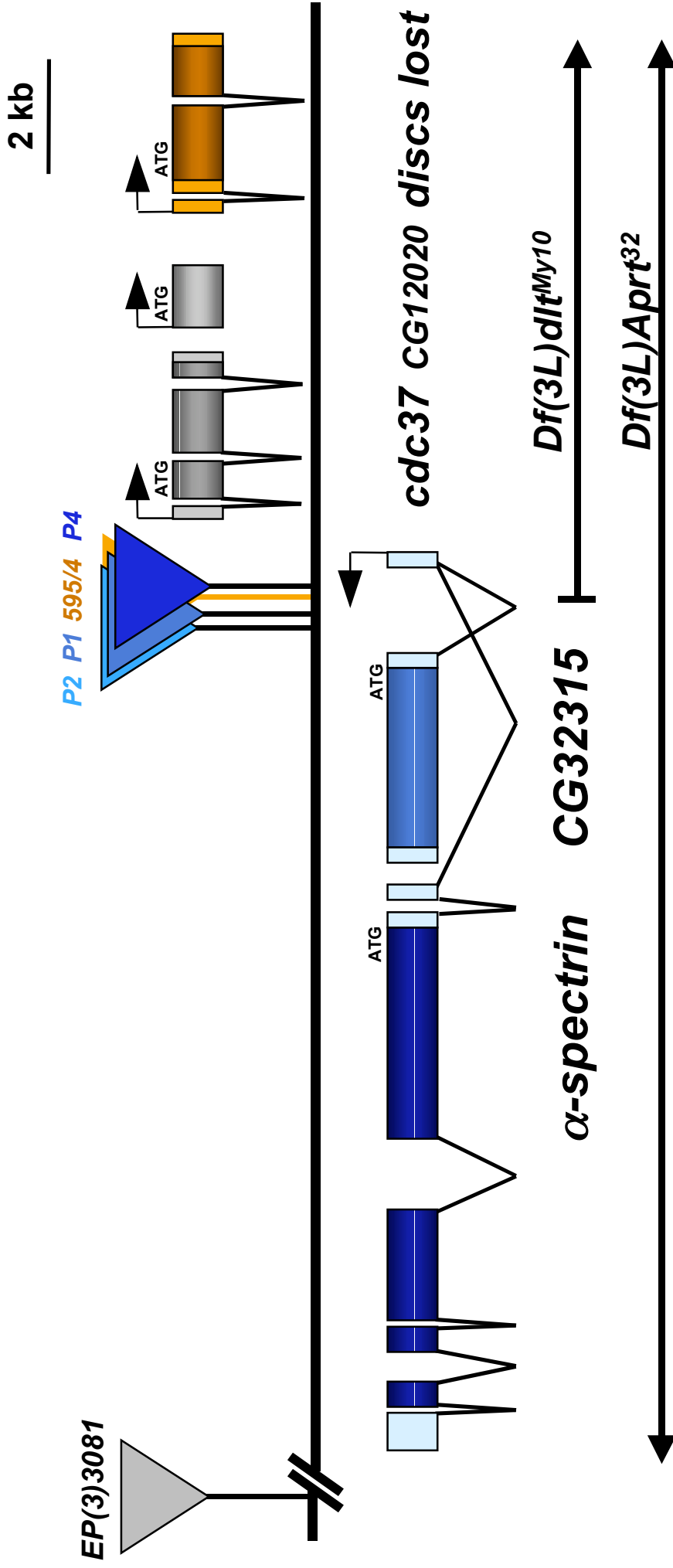


Abb. 6 Die genomische *klötzchen* Region. *klötzchen* kartiert in den Bereich 62B auf dem linken Arm von Chromosom 3. Die drei P-Element induzierten *klötzchen* Allele (*P1*, *P2* und *P4*) wurden ausgehend von dem *EP(3)3081* induziert und kartieren alle innerhalb des ersten Introns von *α-spectrin*. *α-spectrin* (dunkelblau) teilt sich das erste, nicht translatierte Exon mit dem Gen *CG32315* (hellblau). Die *klötzchen* P-Elemente betreffen sowohl *α-spectrin* Mutationen und *klötzchen* Mutationen als auch Mutationen des Gens *discs lost* (braun). Die *α-spectrin*, *discs lost* und die *klötzchen* EMS- und P-Element induzierten Mutationen komplementieren *cdc37* Mutationen. Die beiden Defizienzen *Df(3L)dlt^{My10}* und *Df(3L)Aprt³²* decken alle Mutationen der Region auf. Der linke Bruchpunkt der *Df(3L)dlt^{My10}* ist angegeben. Für das Gen *CG12020* ist noch keine Funktion beschrieben. Die offenen Leseraster der einzelnen Gene sind farblich hervorgehoben.

Ergebnisse

klo^{P1} und *klo*^{P4}. Dieses P-Element komplementiert das EMS-induzierte *discs lost* Allel *dlt*^{dre1} nicht. Die beiden Allele unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Letalitätsphasen. *dlt*^{595/4} ist embryonal letal, während *dlt*^{dre1} zu pupaler Letalität führt. Ausgehend von dem P-Element induzierten Allel *dlt*^{595/4} wurde durch einen partiellen „jump out“ eine kleine Defizienz der *discs lost* Region erzeugt, *Df(3L)dlt*^{My10}. Zudem liegt zwischen *α-spectrin* und *discs lost* das essentielle Gen *cdc37*, das in einem Screen auf modifizierende Mutationen des *sevenless* Phänotyps identifiziert wurde (Simon et al., 1991; Cutforth and Rubin, 1994) und das vorhergesagte Gen *CG12020* (BDGP). Die genaue Lage der einzelnen Gene zueinander ist in Abbildung 6 dargestellt.

In der Publikation des Gens *discs lost* ist beschrieben, dass die *discs lost* Allele *dlt*^{595/4} und *dlt*^{dre1} sowohl *cdc37* Mutationen, als auch *α-spectrin* Mutationen komplementieren (Bhat et al., 1999). Die gesamte Region 62A/B wurde sättigend mutagenisiert (Sliter et al., 1989). Aus dieser Mutagenese stammt u.a. das Allel *dlt*^{dre1}. Die Allele der einzelnen Komplementationsgruppen der Region sind nicht mehr erhältlich (ausgestorben; T. Sliter, persönliche Mitteilung). Es konnten aber einzelne Allele der Gene *α-spectrin*, *cdc37* und *discs lost* von den entsprechenden Arbeitsgruppen bezogen werden.

Zur Klärung, welches der Gene *klötzchen* kodiert, wurde eine Komplementationsanalyse mit allen verfügbaren Allelen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

	<i>klo</i> ^{EMS}	<i>klo</i> ^{P3}	<i>klo</i> ^{P1,P2,P4}	<i>α-spect</i> ^{rg41}	<i>dlt</i> ^{595/4}	<i>dlt</i> ^{dre1}	<i>dlt</i> ^{My10}	<i>cdc37</i>
<i>klo</i> ^{EMS}	-							
<i>klo</i> ^{P3}	letal	-						
<i>klo</i> ^{P1,P2,P4}	letal	letal	-					
<i>α-spect</i> ^{rg41}	letal	letal	letal	-				
<i>dlt</i> ^{595/4}	letal	letal	letal	letal	-			
<i>dlt</i> ^{dre1}	+	+	p-letal	+	p-letal	-		
<i>dlt</i> ^{My10}	letal	letal	letal	letal	letal	p-letal	-	
<i>cdc37</i>	+	+	+	+	+	+	letal	-

Komplementationsverhalten der Gene der *klötzchen* Region. +: Komplementation der Allele. letal: embryonale bzw. larvale Letalität, p-letal: pupale Letalität.

Die Komplementationsanalyse zeigt die genetische Komplexität der Region. Der wichtigste Befund ist, dass alle *klötzchen* Allele (EMS- und P-Element induzierte Mutationen)

Ergebnisse

das molekular definierte α -spectrin Null-Allel α -spec^{rg41} nicht komplementieren. Die *klötzchen* P-Elemente lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Allele klo^{P1} , klo^{P2} und klo^{P4} , also die molekular definierten Insertionen, verhalten sich gleich und komplementieren weder α -spectrin noch *discs lost*. Das Allel klo^{P3} verhält sich genetisch wie die *klötzchen* EMS-Allele, die alle das *discs lost* EMS-Allel dlt^{dre1} komplementieren. Ein unerwartetes Ergebnis dieser Komplementationsanalyse ist die nicht-Komplementation der *discs lost* und α -spectrin Mutationen, die im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen steht (Bhat et al., 1999); (die verwendeten Allele sind identisch). *klötzchen*, α -spectrin und *discs lost* komplementieren das *cdc37* Allel $cdc37^{E(sev)3B}$. Die kleine Defizienz $Df(3L)dlt^{My10}$ sowie die nicht aufgeführte, größere Defizienz der Region $Df(3L)Aprt^{32}$ komplementieren keines der Gene.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass *klötzchen* und α -spectrin genetisch nicht voneinander zu trennen sind und eine Komplementationsgruppe bilden. Die molekular definierten *klötzchen* P-Elemente klo^{P1} , klo^{P2} und klo^{P4} , sowie das *discs lost* P-Element $dlt^{595/4}$ stellen Doppelmutationen von α -spectrin/*klötzchen* und *discs lost* dar. Zur Kontrolle der Angaben der *discs lost* Publikation wurde der Insertionsort des P-Elements $dlt^{595/4}$ und der linke Bruchpunkt der Defizienz $Df(3L)dlt^{My10}$ mittels PCR überprüft. Beide Allele entsprechen den Beschreibungen der Publikation (Bhat et al., 1999; Abb. 6).

3.2.2.4 Reversion der *klötzchen* P-Elemente

Zum Nachweis, dass die Insertionen der *klötzchen* P-Elemente innerhalb des ersten Introns von α -spectrin bzw. *CG32315* für die nicht-Komplementation der *klötzchen* EMS-Allele verantwortlich sind, wurde eine Reversionsmutagenese durchgeführt. Hierzu wurde das P-Element mit Hilfe des Transposase-Stammes $\Delta 2-3$ mobilisiert und auf den Verlust des P-Elements selektioniert. Die Analyse wurde exemplarisch für das P-Element klo^{P2} durchgeführt. Es wurden 20 unabhängig erzeugte, weißäugige Tiere auf Komplementation der *klötzchen* Letalität getestet. In 12 Kreuzungen kam es zu einer Komplementation der *klötzchen* EMS Allele. Die Insertion des P-Elementes innerhalb des ersten Exons von α -spectrin bzw. *CG32315* ist somit für die Letalität in Transheterozygose zu den *klötzchen* EMS-Allelen verantwortlich. Bestätigt wird dieser Befund durch das unabhängig induzierte *discs lost* Allel $dlt^{595/4}$ (Bhat et al., 1999), das sich genetisch identisch wie die *klötzchen* P-Elemente verhält (Tabelle 3).

3.2.2.5 Phänotypische Analyse der *klötzchen* P-Elemente

Die P-Element induzierten *klötzchen* Allele und die kleine Defizienz *Df(3L)dlt^{My10}* wurden phänotypisch analysiert, um festzustellen, ob sie zu einem ähnlichen Phänotyp wie die *klötzchen* EMS-Allele führen. Die vier *klötzchen* P-Elemente zeigen, ebenso wie die Defizienz *Df(3L)dlt^{My10}*, einen starken ZNS-Phänotyp. Neben der deutlichen Fusion der Kommissuren kommt es besonders bei dem Allel *klo^{P2}* und der Defizienz *Df(3L)dlt^{My10}* zu einem nahezu vollständigen Verlust der Konnektive (Abb. 7 C, F, Pfeile). Die Allele zeigen eine ähnliche Variabilität hinsichtlich des ZNS-Phänotyps wie die *klötzchen* EMS-Allele. So findet man bei beiden Allelen auch mutante Embryonen, die einen etwas schwächeren Phänotyp hinsichtlich der Reduktion der Konnektive zeigen. Die anderen drei P-Element induzierten *klötzchen* Allele ähneln in ihrem Phänotyp den EMS-induzierten Allelen *klo^{D4-65}* und *klo^{E2-26}*, wobei *klo^{P1}* das schwächste Allel ist. Aber auch dieser ZNS-Phänotyp ist immer noch stärker als der Phänotyp des schwachen *klötzchen* EMS-Allels *klo^{N2-141}* (vergleiche Abb. 7 B mit Abb. 2 E). Der Phänotyp des *discs lost* P-Elements *dlt^{595/4}* ist ähnlich stark wie der von *klo^{P4}* (Daten nicht gezeigt).

Um sicherzugehen, dass die beobachteten ZNS-Phänotypen ausschließlich durch den Verlust von *klötzchen* zustande kommen, wurden transheterozygote Kombinationen zwischen *klötzchen* EMS- und P-Element induzierten Allelen und mit der Defizienz *dlt^{My10}* analysiert. Exemplarisch sind die Phänotypen mutanter Embryonen der folgenden Genotypen dargestellt: *klo^{E2-26}/klo^{P1}*, *klo^{D4-65}/klo^{P4}* und *klo^{E2-26}/dlt^{My10}* (Abb. 7 G-I). Der Phänotyp des stärksten *klötzchen* EMS-Allels *klo^{E2-26}* wird in Transheterozygose zu dem schwächsten *klötzchen* P-Elements *klo^{P1}* leicht abgeschwächt. Der Phänotyp ist etwas schwächer als der Phänotyp der transheterozygoten Embryonen der beiden starken Allele *klo^{D4-65}* und *klo^{P4}*. Der stärkste Phänotyp kommt bei der Kreuzung des Allel *klo^{E2-26}* mit der Defizienz *dlt^{My10}* zustande. Dieser Phänotyp entspricht in etwa dem Phänotyp von homozygoten *klo^{E2-26}* Embryonen, so dass es sich bei *klo^{E2-26}* wahrscheinlich um ein Nullmutation bzw. eine starke hypomorphe Mutation des *klötzchen* Gens handelt. Die Analyse der transheterozygoten Phänotypen hat gezeigt, dass der *klötzchen* ZNS-Phänotyp nicht durch Mutationen im Hintergrund der einzelnen Chromosomen zustande kommen kann.

3.2.2.6 Genetischer und phänotypischer Vergleich von *klötzchen* und α -spectrin

Da die *klötzchen* Allele das α -spectrin Null-Allel α -spec^{rg41} nicht komplementieren, wurden weitere α -spectrin Allele auf eine Komplementation von *klötzchen* getestet. Das

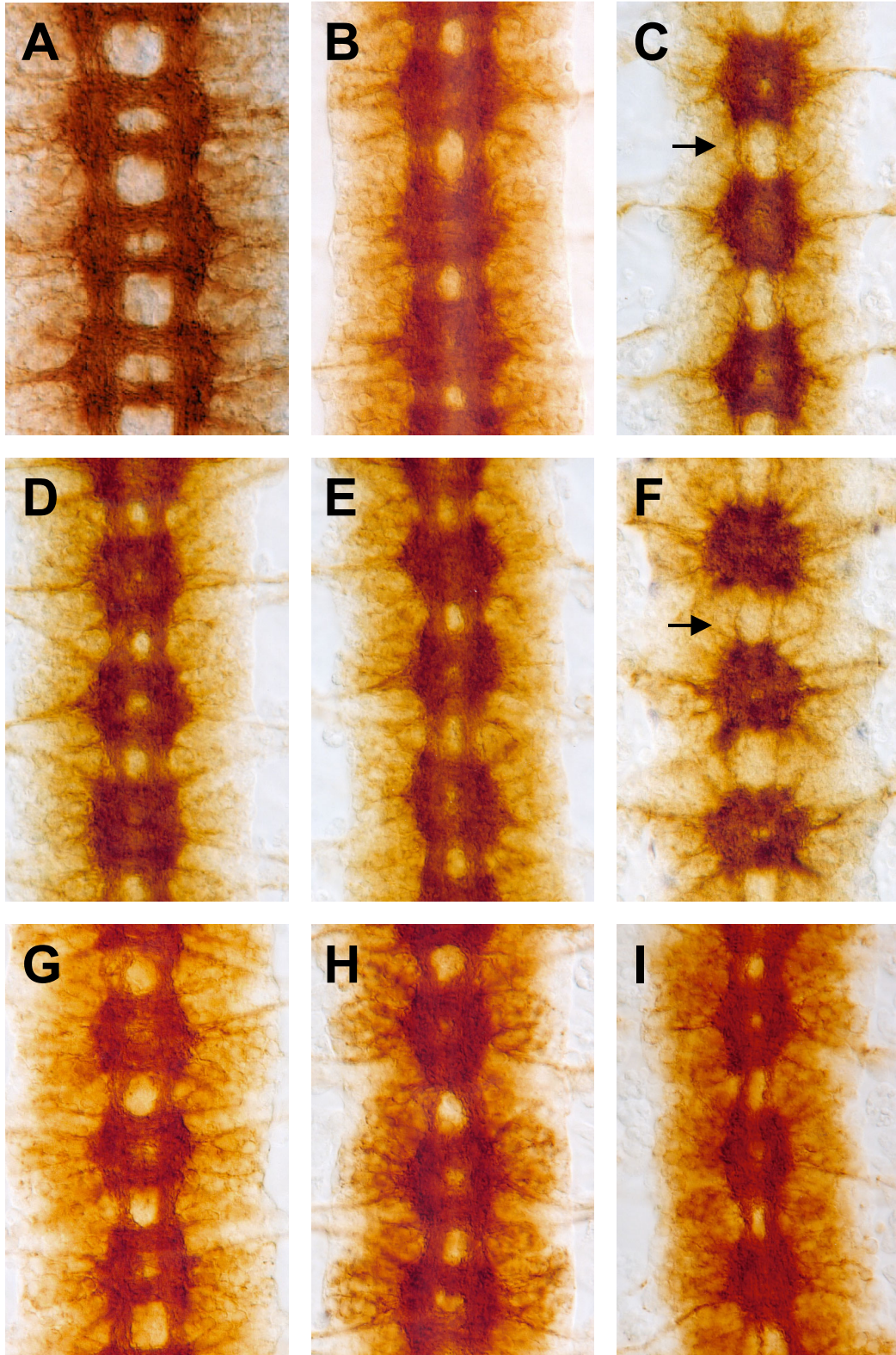


Abb. 7 Die ZNS-Phänotypen der P-Element induzierten *klötzchen* Allele. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. (A) Wildtyp; (B) *klo^{P1}*; (C) *klo^{P2}*; (D) *klo^{P3}*; (E) *klo^{P4}*; (F) *Df(3L)dlt^{My10}*; (G) *klo^{P1}/klo^{E2-26}*; (H) *klo^{P4}/klo^{D4-65}*; (I) *klo^{E2-26}/Df(3L)dlt^{My10}*. Die P-Element induzierten *klötzchen* Mutationen und die *Df(3L)dlt^{My10}* führen zu einem fusionierten Kommissurenphänotyp. Auch bei transheterozygoter Embryonen von EMS- und P-Element induzierten *klötzchen* Allelen kommt es zu einer Fusion der Kommissuren (G, H).

Ergebnisse

zweite, molekular definierte Allel $\alpha\text{-spec}^{rg35}$ (ein hypomorphes Allel) und die beiden molekular nicht genauer charakterisierten Allele $\alpha\text{-spec}^{lg32}$ und $\alpha\text{-spec}^{lg88}$ komplementieren die verschiedenen *klötzchen* Allele nicht. Für $\alpha\text{-spectrin}$ existiert ein Minigen-Konstrukt (die $\alpha\text{-spectrin}$ cDNA unter der Kontrolle des *ubiquitin*-Promotors), mit dem die Letalität des Allels $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ über die Defizienz *Df(3L)R2* gerettet werden konnte (Lee et al., 1993). Auch die transheterozygote Letalität der *klötzchen* Allele klo^{D4-65} über klo^{E2-26} konnte durch ein Einkreuzen dieses $\alpha\text{-spectrin}$ Minigens gerettet werden. Die *klötzchen* Allele entsprechen somit in allen genetischen Aspekten den $\alpha\text{-spectrin}$ Allelen.

Im Unterschied zu den vielfältigen embryonalen Phänotypen der *klötzchen* Allele (s.o.) sind in der Literatur keine embryonalen Phänotypen für $\alpha\text{-spectrin}$ beschrieben worden. Das Nullallel $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ führt zur Letalität im ersten Larvalstadium (L1). Die mutanten Larven zeigen Defekte im Mitteldarm, hier kommt es zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte und zu Formveränderungen des apikalen Mikrovilli-Saums (Lee et al., 1993). Durch eine klonale Analyse konnte gezeigt werden, dass der Verlust von $\alpha\text{-spectrin}$ innerhalb des adulten Follikelepithels der Ovarien zu Defekten der Zellform führt, die besonders die apikalen Bereiche betreffen (Lee et al., 1997).

Zur Überprüfung der Literatur-Angaben wurde der ZNS-Phänotyp von $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ mutanten Embryonen analysiert. Im Gegensatz zu *klötzchen* mutanten Embryonen kommt es in $\alpha\text{-spectrin}$ mutanten Embryonen zu keinem fusionierten Kommissurenphänotyp, das ZNS entspricht dem Wildtyp (Vergleiche Abb. 8 B, C). Allerdings ergab die Analyse von transheterozygoten *klötzchen*/ $\alpha\text{-spectrin}$ Embryonen, dass es neben der genetischen Interaktion der *klötzchen* und $\alpha\text{-spectrin}$ Allele auch eine phänotypischen Interaktion gibt. Die Kombination von $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ mit den beiden starken *klötzchen* Allelen klo^{D4-65} und klo^{E2-26} führt zu einem leichten ZNS-Phänotyp (Abb. 8 E, F). Dieser Phänotyp ist aber deutlich schwächer, als der beider *klötzchen* Allele in Transheterozygose (Abb. 8 D). Somit ist der Phänotyp homozygoter Embryonen eines molekular definierten Null-Allels ($\alpha\text{-spec}^{rg41}$) schwächer, als der Phänotyp in Transheterozygose zu anderen Allelen des vermeintlich gleichen Gens.

Ein mögliche Erklärung für diese Befunde wäre, dass die veröffentlichten Ergebnisse der molekularen Analyse der Mutation $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ fehlerhaft sind. Die Sequenzierung des Allels wurde wiederholt, um sicherzustellen, dass die Angaben über die molekulare Natur der Mutation zutreffend sind. Die Verwendung eines GFP-markierten Balancer-Chromosoms

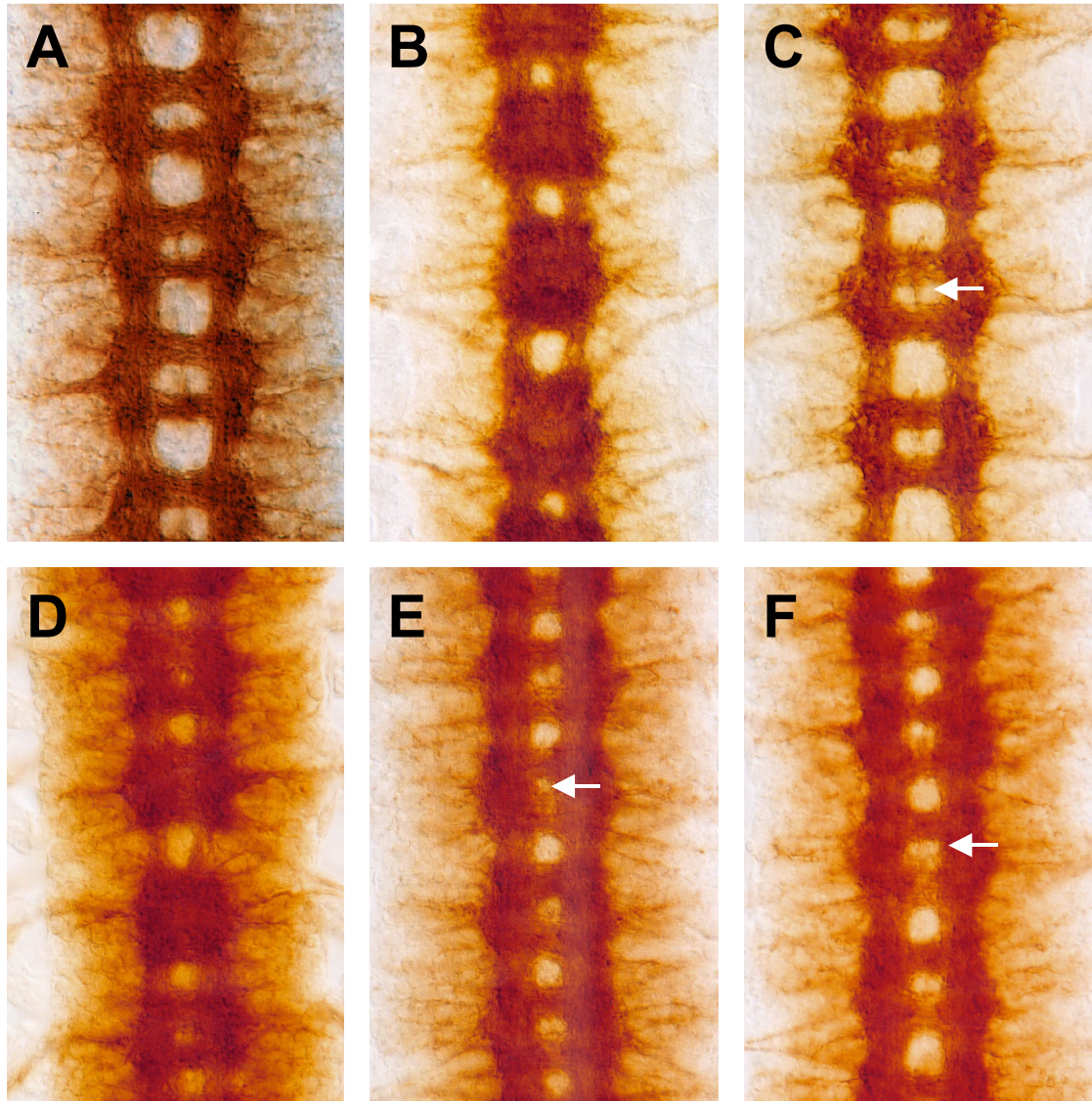


Abb. 8 Vergleich der ZNS-Phänotypen von *klötzchen* und α -spectrin Mutationen. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. (A) Wildtyp; (B) *klo^{D4-65}*; (C) *α -spec^{rg41}*; (D) *klo^{D4-65}/klo^{E2-26}*; (E) *klo^{D4-65}/ α -spec^{rg41}*; (F) *klo^{E2-26}/ α -spec^{rg41}*. Im Gegensatz zu dem *klötzchen* Phänotyp (B, D) kommt es in homozygot mutante Embryonen des *α -spectrin* Null-Allels *α -spec^{rg41}* zu keinen Defekten bei der Entwicklung des embryonalen ZNS (C). Interessanterweise kommt es in transheterozygoten Embryonen von *α -spectrin* mit den beiden starken *klötzchen* Allelen zu einem leichten fusionierten Kommissurenphänotyp (E, F, Pfeile). Der Abstand zwischen der anterioren und posterioren Kommissur ist geringer als im Wildtyp (Vergleiche A, E und F). Dieser Phänotyp ist aber deutlich schwächer als der Phänotyp der beiden *klötzchen* Mutationen in Transheterozygose (D).

Ergebnisse

erlaubte die Selektion homozygot mutanter $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ Embryonen. Die DNA der Embryonen wurde isoliert und das entsprechende DNA-Fragment mit Hilfe von 2 flankierenden Primern amplifiziert. Die Sequenzierung des PCR-Produktes und anschließende Sequenzanalyse bestätigte die Literaturangaben (Lee et al., 1993). Das Allel $\alpha\text{-spec}^{rg41}$ weist die beschriebene 20 bp Deletion auf, die zu einem Frameshift und vorzeitigem Stopp-Codon im $\alpha\text{-spectrin}$ ORF führt.

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz der ZNS-Phänotypen wäre, dass die *klötzchen* Mutationen nicht $\alpha\text{-spectrin}$, sondern ein anderes Gen betreffen, das genetisch sehr eng mit $\alpha\text{-spectrin}$ interagiert. Aufgrund der genomischen Organisation der Umgebung der *klötzchen* P-Element Insertionen wäre das Gen *CG32315* ein möglicher Kandidat.

Das genetisch identische Verhalten der *klötzchen* und $\alpha\text{-spectrin}$ Allele bedingt, dass sich der Verlust von *klötzchen* auf die Menge oder die Verteilung des α -Spectrin Proteins auswirken müsste.

3.2.3 Die Funktion von *klötzchen* und $\alpha\text{-spectrin}$

3.2.3.1 Der Aufbau des Spectrin Zytoskeletts

α -Spectrin ist eine Komponente des Spectrin Netzwerkes, das ein wichtiger Bestandteil des submembranösen, zellulären Zytoskeletts ist. Zusammen mit β -Spectrin bildet es Heterodimere, die sich antiparallel zu Multimeren aneinanderlagern. Diese Spectrin Multimere vernetzen Aktinfilamente und können zugleich über eine Interaktion mit Adapterproteinen wie Ankyrin eine Verbindung zwischen dem Actin-Zytoskelett und der Zellmembran herstellen (Abb. 9; Bennett and Baines, 2001; De Matteis and Morrow, 2000).

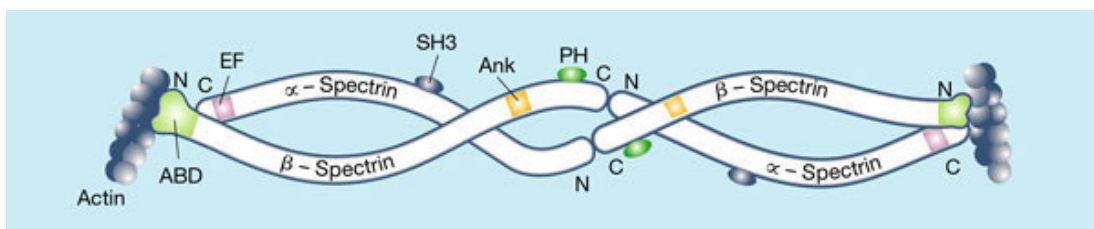


Abb. 9 Schematische Darstellung eines Spectrin Heterotetrameres. Die wichtigsten Bindungsstellen für die Interaktion mit anderen Molekülen sind eingezeichnet. α -Spectrin besitzt eine EF-Hand, die Calcium bindet und eine SH3-Domäne über die α -Spectrin mit anderen Proteinen interagieren kann. β -Spectrin kann direkt an Aktin (ABD) und Ankyrin (Ank) binden (Pinder and Baines, 2000).

Ergebnisse

Drosophila melanogaster besitzt ein α -spectrin und zwei unterschiedliche β -spectrin Gene, β -spectrin und β_H -spectrin. Die Zusammensetzung der Dimere ist unterschiedlich in den einzelnen subzellulären Kompartimenten. So findet man α/β -Dimere hauptsächlich in basolateralen Bereichen und α/β_H -Dimere in apikalen Bereichen polarer Zellen.

3.2.3.2 *klötzchen* beeinflusst die α -Spectrin Proteinmenge

Zum direkten Nachweis, ob die *klötzchen* Mutationen nicht nur genetisch mit α -spectrin interagieren, sondern auch direkt die α -Spectrin Proteinmenge in der Zelle betreffen, wurden homozygot mutante *klötzchen* Embryonen mit einem anti- α -Spectrin Antikörper analysiert. Im Wildtyp ist α -Spectrin entlang der Zellmembran jeder Zelle des zentralen Nervensystem nachweisbar (Abb. 10 B). Der gleichzeitige Nachweis mit dem axonalen Marker BP102 zeigt die Anordnung der Kommissuren und Konnektive. Man erkennt eine leichte Erhöhung an α -Spectrin Protein im Bereich der Kommissuren (Abb. 10 A, B). Für diese spezifische Lokalisation von α -Spectrin in den kommissuralen Bereichen gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte α -Spectrin selektiv in diesem axonalen Kompartiment der kommissuralen Axone akkumulieren oder die ML-Gliazellen, die die Kommissuren umhüllen, sind für die erhöhte α -Spectrin Expression verantwortlich (siehe auch Abb. 11).

klötzchen mutante Embryonen wurden mit Hilfe eines markierten Balancers identifiziert. Zu Beginn der Embryogenese findet man normale α -Spectrin Protein Mengen in *klötzchen* mutanten Embryonen. In späteren Entwicklungsstadien (ab Stadium 15) kommt es jedoch zu einem nahezu vollständigen Verlust von α -Spectrin (Abb. 10 D). Vereinzelt sind Mittellinienzellen zu erkennen, die noch schwache α -Spectrin Proteinmengen aufweisen. Bei diesen Zellen handelt es sich sehr wahrscheinlich um ML-Neurone, die auch im Wildtyp die stärkste α -Spectrin Expression zeigen. Für das α -spectrin Allel α -spec^{rg41} konnte eine ähnliche Reduktion der α -Spectrin Proteinlevel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die *klötzchen* Allele interagieren genetisch mit α -spectrin und in homozygot mutanten Embryonen aller *klötzchen* EMS-Allele kommt es zu einem Verlust von α -Spectrin zum Ende der Embryogenese.

3.2.3.3 α -Spectrin wird in der ventralen Mittellinie exprimiert

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass α -Spectrin in den meisten Zellen des ventralen Bauchmarks vorhanden ist. Eine genaue Aussage über eine gliale oder neuronale Expression

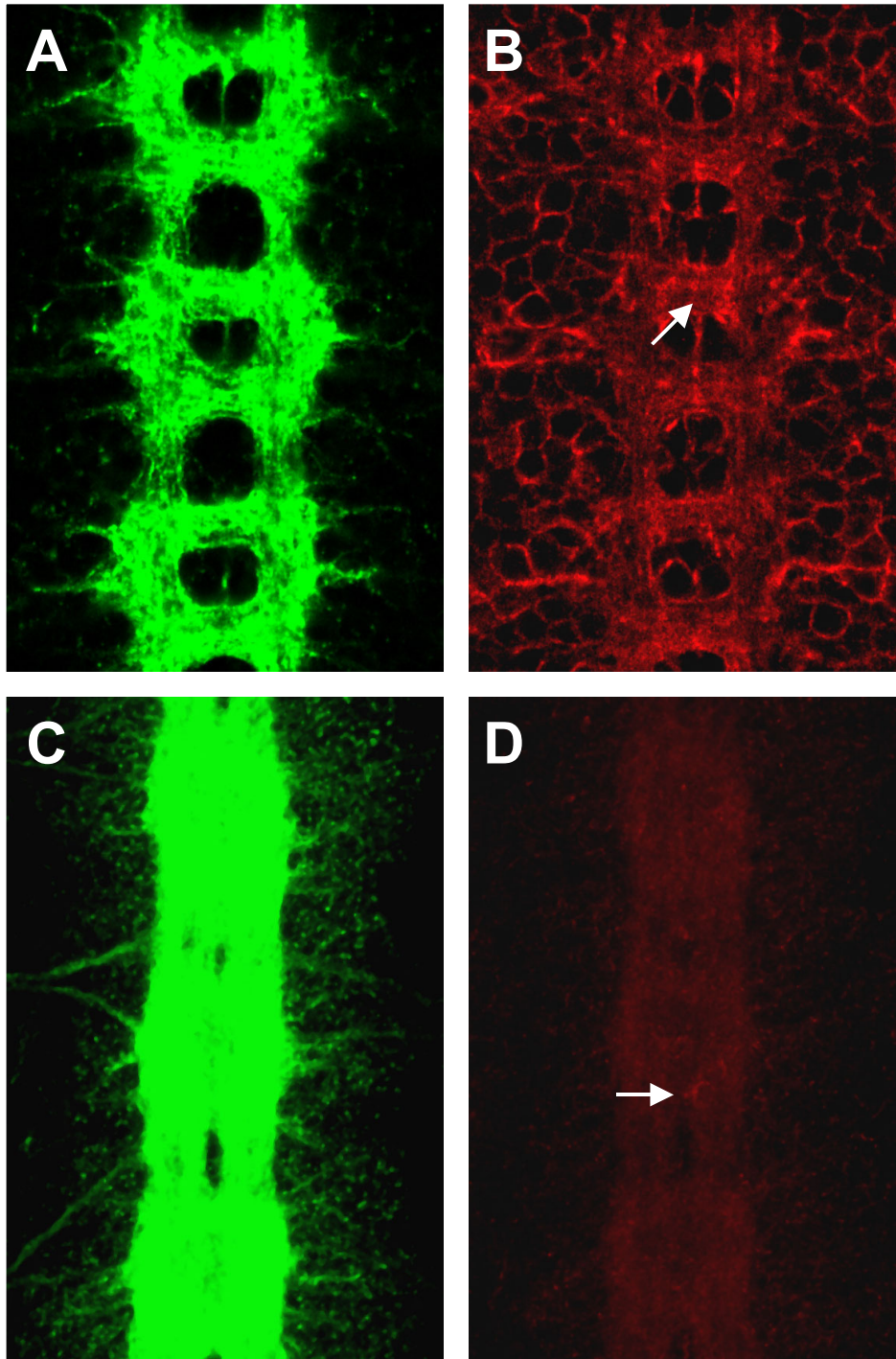


Abb. 10 *klötzchen* beeinflusst die α -Spectrin Expression. Ventrale Aufsichten auf das ZNS in Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Die Verteilung von α -Spectrin wurde mit einem polyklonalen anti- α -Spectrin Antikörper (rot) und das axonale Muster mit dem mAb BP102 (grün) analysiert. (A, B) Wildtyp (eine Fokusebene); (C, D) *klötzchen* (*klötzchen*) (*klötzchen*) (Projektion konfokaler Bildstapel, 20 μm in 0,5 μm Schritten). Im Wildtyp ist α -Spectrin in allen Zellen des zentralen Nervensystems nachweisbar. Eine leicht erhöhte Expression ist im Bereich der Kommissuren zu erkennen (B, Pfeil). In *klötzchen* mutanten Embryonen kommt es am Ende der Embryogenese zu einem nahezu vollständigen Verlust des α -Spectrin Proteins. Vereinzelt ist noch eine Restexpression in Mittellinienzellen detektierbar (D, Pfeil).

Ergebnisse

konnte anhand der Daten jedoch nicht gemacht werden. Für eine detailliertere Analyse wurden gleichzeitig mit α -Spectrin auch die ML-Neurone und ML-Gliazellen mit Hilfe des oben beschriebenen *sl*-GAL4/UAS-CD2 Systems markiert.

Die laterale Ansicht der Mittellinienzellen eines Stadium 14 Embryos zeigt, dass die ML-Neuronen die höchsten α -Spectrin Level exprimieren (Abb. 11 A-C). Allerdings ist α -Spectrin auch in den ML-Gliazellen nachweisbar. So ist selbst in einer einzelnen, konfokalen Fokusebene α -Spectrin in den apikalen Zellfortsätzen der ML-Gliazellen detektierbar, also genau in jenem Zellkompartiment, das in *klötzchen* mutanten Embryonen einen Phänotyp zeigt (Abb. 11 Pfeile in A, B). Die Ansicht einer dorsalen Ebene des ZNS zeigt die Axone der Konnektive und der noch nicht getrennten Kommissuren und die basalen Bereiche der ML-Gliazellen. α -Spectrin ist sowohl in den neuronalen Zellen, als auch in den ML-Gliazellen nachweisbar. Zusätzlich erkennt man auch schon in diesen frühen Stadien die diffuse α -Spectrin Verteilung im Bereich der segmentalen Kommissuren (Abb. 11 D). α -Spectrin ist in allen Zelltypen vorhanden, die in *klötzchen* mutanten Embryonen einen Phänotyp zeigen.

3.2.3.4 Die mRNA Expression von α -spectrin und CG32315

Aufgrund der genomischen Organisation der Region könnte *klötzchen* auch durch das Gen *CG32315* kodiert werden. Grundvoraussetzung wäre die embryonale Expression des Gens. Aufgrund der engen genetischen Interaktion von *klötzchen* mit α -spectrin sollte es zudem in einem ähnlichen Muster wie α -spectrin exprimiert sein. Zur vergleichenden Analyse wurden von beiden Transkripten spezifische Dig-markierte *anti-sense* RNA-Sonden angefertigt, die nicht die gemeinsame Sequenz des ersten Exons beinhalten. Als Kontrolle für eine spezifische Hybridisierung wurden auch *sense* RNA-Sonden generiert und analysiert, die zu keinen spezifischen Signalen führten.

Beide *anti-sense* RNA-Sonden zeigten spezifische Hybridisierungen in Wildtyp Embryonen (Abb. 12). Bei beiden Genen gibt es eine starke maternale mRNA Komponente (Abb. 12 A, B). Die zygotische Expression beider Transkripte ist nahezu ununterscheidbar. Die mRNA beider Gene ist in jedem Gewebe durchgehend bis zum Ende der Embryogenese nachweisbar (Abb. 12 C-L). Eine besonders starke Expression findet sich im Bereich des zentralen Nervensystems (Pfeile in Abb. 12 E, F, I, J) und des Darmes (Pfeile in Abb. 12 K, L). Eine zelltypspezifische Auflösung unterschiedlicher Expressionsstärken innerhalb des Nervensystems ist, mit dem verwendeten, indirekten Nachweis der mRNA über eine

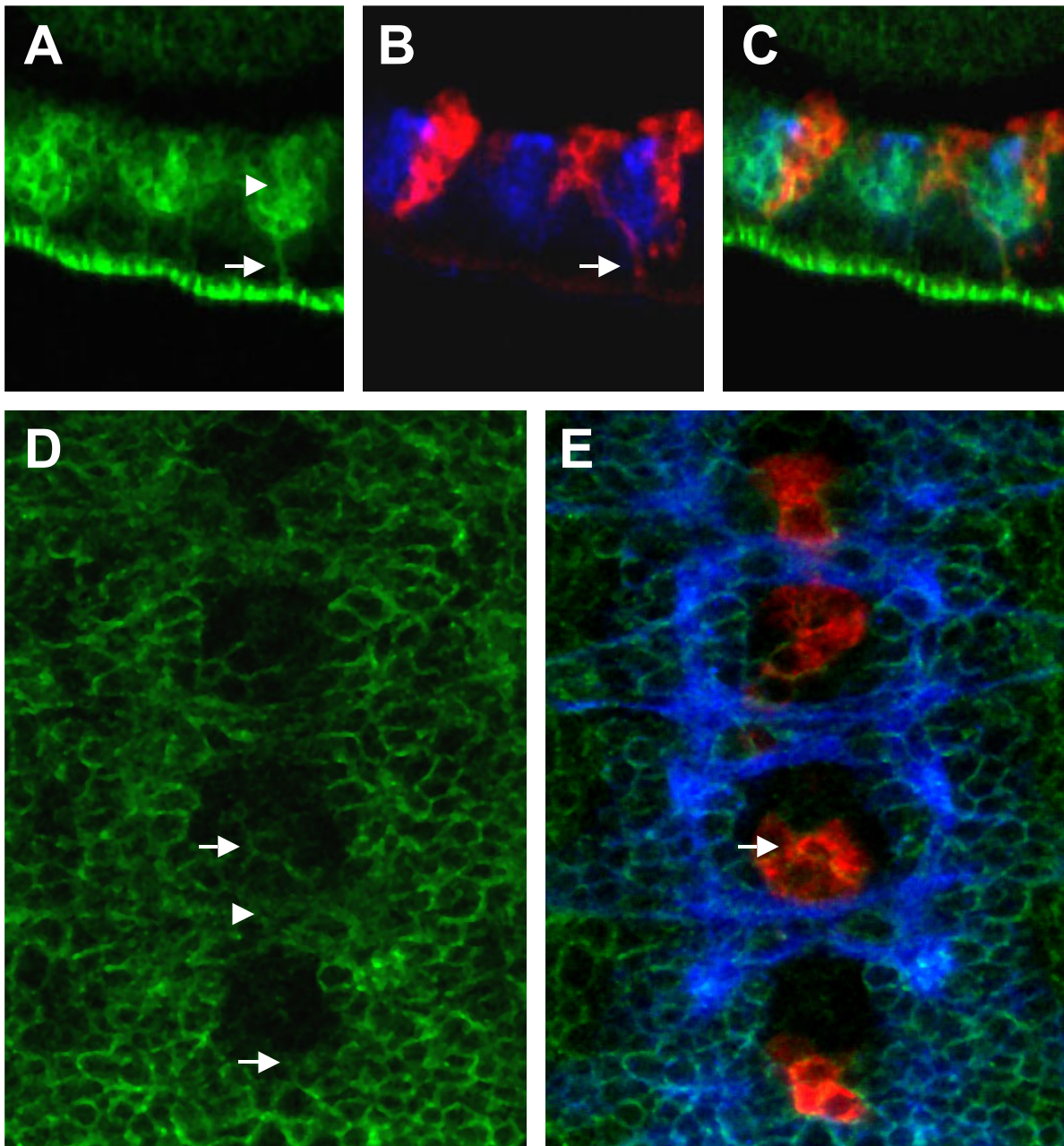


Abb. 11 α -Spectrin wird von ML-Neuronen und ML-Gliazellen exprimiert. Die Zellmembranen der Mittelliniengliazellen sind rot markiert (*sli-GAL4/UAS-CD2*, anti-CD2), alle Neurone blau (anti-HRP) und α -Spectrin grün (anti- α -Spectrin). (A, B, C) Laterale Ansicht (eine Fokusebene) der Mittellinie eines wildtypischen Embryos in Stadium 14. α -Spectrin ist in den apikalen Zellfortsätzen der ML-Gliazellen (A, B, Pfeile) und in den ML-Neuronen (A, Pfeilspitze) vorhanden. (D, E) Dorsale Ansicht (eine Fokusebene) des zentralen Nervensystems eines Stadium 14 Embryos. Die Kommissuren sind noch nicht voneinander getrennt. α -Spectrin ist in den basalen Bereichen der ML-Gliazellen nachweisbar (Pfeile). Eine leichte α -Spectrin Expression findet sich im Bereich der Kommissuren (D, Pfeilspitze).

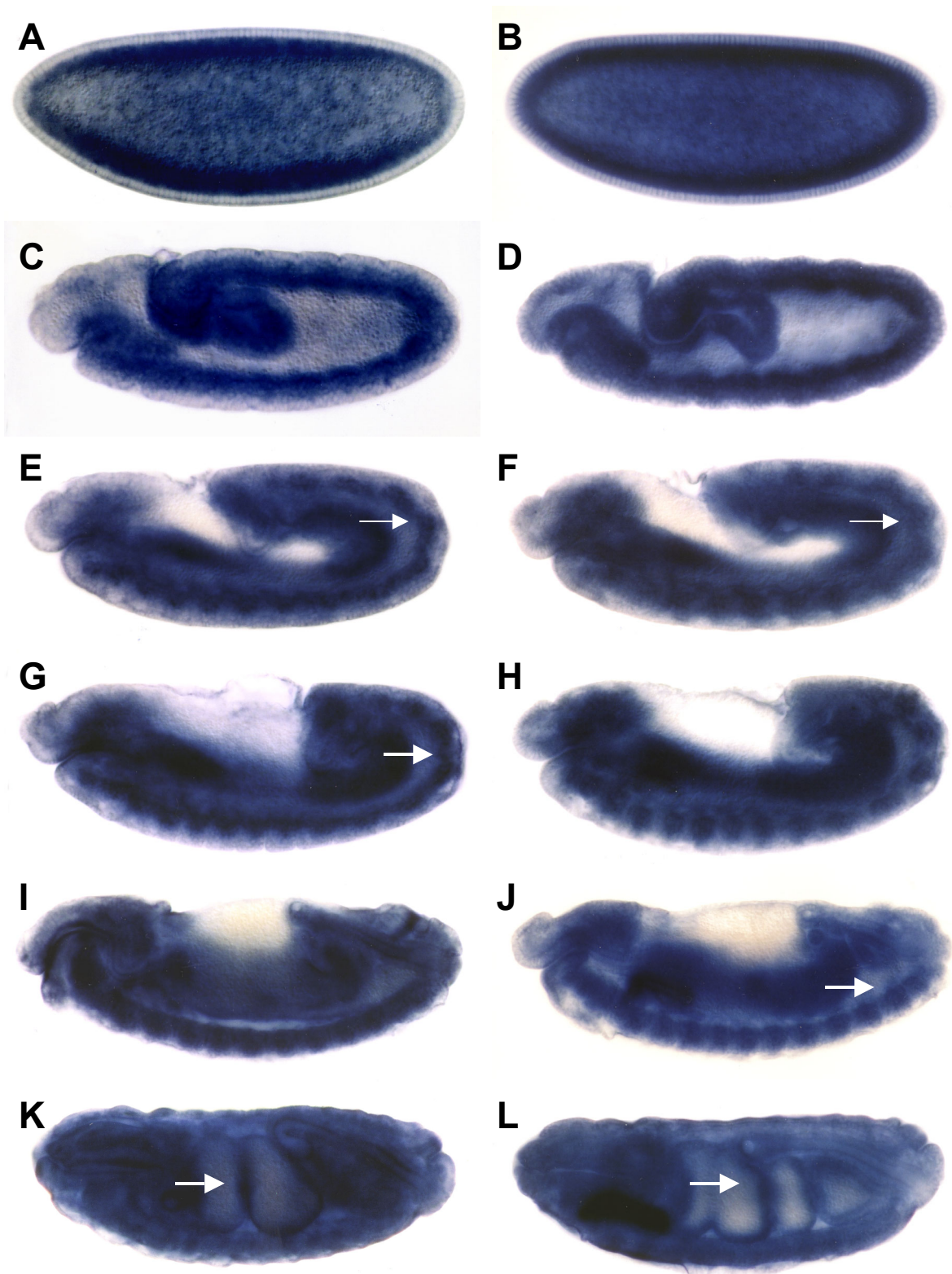


Abb. 12 Vergleich des mRNA-Expressionsmusters von α -spectrin und CG32315. Das mRNA Expressionsmuster wurde durch eine Hybridisierung mit spezifischen DIG-markierten *anti-sense* Sonden an *whole-mount* Embryonen bestimmt. Anterior ist links und dorsal oben. (A, C, E, G, I, K) α -spectrin; (B, D, F, G, H, J, L) CG32315. Die Gene sind nahezu identisch exprimiert. Bei beiden Gene gibt es eine maternale mRNA Komponente (A, B). In späteren Stadien ist die Expression beider Gene in allen Geweben nachweisbar. Eine besonders starke Expression findet sich im Nervensystem (G-J, Pfeile) und im Darm (K-L, Pfeile).

Ergebnisse

alkalische Phosphatase Reaktion, nicht möglich. Beide Gene könnten aufgrund ihres Expressionsmusters für *klötzchen* kodieren. Besonders das Vorhandensein einer starken maternalen Komponente ist in guter Übereinstimmung mit dem relativ späten Auftreten der *klötzchen* Phänotypen des ZNS, des Darmes und der Muskulatur.

3.2.3.5 Postembryonale Funktionen von *klötzchen*

Das Vorhandensein einer maternalen Komponente, die für *α -spectrin* und *CG32315* nachgewiesen werden konnte, erschwert die funktionale Analyse eines Gens. Um diesen maternalen Einfluß bei der Charakterisierung der *klötzchen* Funktion vernachlässigen zu können, und um mögliche postembryonale Funktionen von *klötzchen* aufzudecken, wurden klonale Analysen durchgeführt.

Die *klötzchen* Mutationen *klo^{D4-65}* und *klo^{E2-66}* wurden auf das Chromosom FRT80B rekombiniert. Die FRT-Sequenz am Centromer des Chromosoms ermöglicht die gewebspezifische Erzeugung mutanter Zellklone (Xu and Rubin, 1993). Anhand einer zellspezifischen Markierung kann zwischen wildtypischen, *klötzchen* transheterozygoten und *klötzchen* homozygoten Zellen innerhalb des Gewebes unterschieden werden. Die Analyse wurde mit Hilfe eines *Flipase* Gens, das entweder durch einen *heat-shock* Promotor (*hsFlp*) (Xu and Rubin, 1993) oder einen *eyeless* Promotor (*eyFlp*) (Newsome et al., 2000) kontrolliert wurde, durchgeführt.

Die wildtypische α -Spectrin Verteilung innerhalb der Augenimaginalscheibe ist in Abbildung 13 dargestellt. α -Spectrin ist in den Peripodialzellen, die die Epithelschicht der Imaginalscheibe umgeben, und in allen Epithelzellen der Scheibe nachweisbar. α -Spectrin ist auch an den Zellmembranen der Photorezeptorzellen vorhanden; die Konturen der einzelnen Photorezeptor-Cluster sind deutlich zu erkennen (Abb. 13 A, Pfeil). Zusätzlich findet man α -Spectrin entlang des Bolwig-Nervs, der das larvale Lichtwahrnehmungsorgan mit dem Gehirn verbindet, und innerhalb des optischen Stiels (Abb. 13 A, Pfeilspitzen). Durch den optischen Stiel projizieren die Axone der Photorezeptor-Zellen in die optischen Loben. Die Expression im optischen Stiel kommt möglicherweise, ähnlich wie die α -Spectrin Expression innerhalb der embryonalen Kommissuren, durch eine α -Spectrin Expression in den Gliazellen der Augenscheibe zustande.

In einem ersten Ansatz wurden *klötzchen* mutante Zellklone mit Hilfe des *hsFlp*-Chromosoms induziert. Die Unterscheidung zwischen wildtypischen und *klötzchen* mutanten

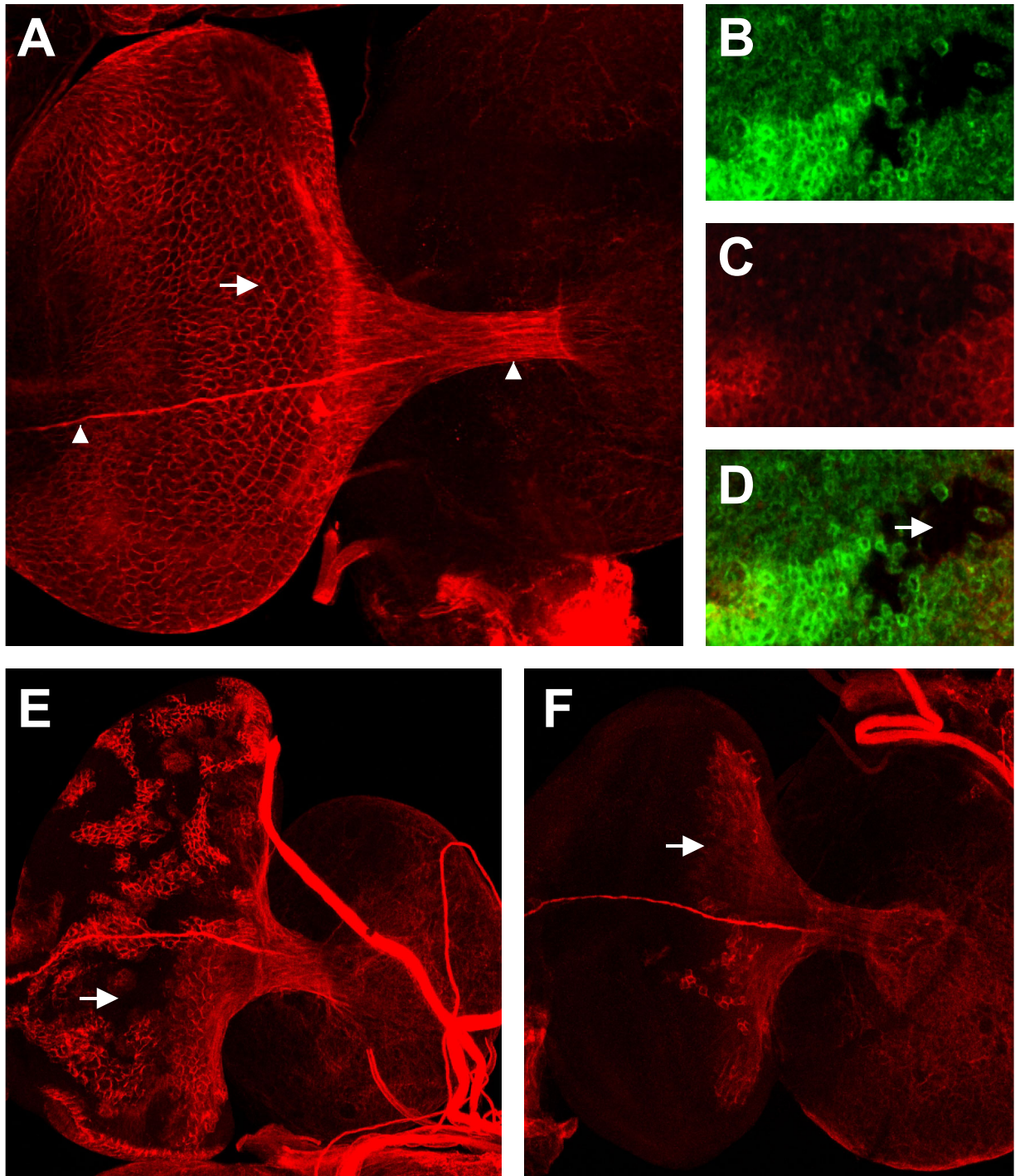


Abb. 13 In *klötzchen* mutanten Zellen kommt es zu einem Verlust von α -Spectrin. Präparationen von Augenimaginalscheiben, anterior ist links. Die *klötzchen* Klone wurden mit α -Spectrin (rot) und einem mAb gegen Myc (grün) analysiert. (A) Wildtyp; (B-C) *hsFlp klo^{E2-66}*; (E, F) *eyFlp klo^{E2-66}*. Im Wildtyp ist α -Spectrin in den Peripodialzellen und den Photorezeptorzellen nachweisbar (A, Pfeil). Im optischen Stiel und entlang des Bolwig-Nerves ist eine hohe Expression zu erkennen (A, Pfeilspitzen). *klötzchen* mutante Zellklone wurden sowohl mit der *hsFlp*- als auch mit der *eyFlp*-Technik generiert. Die Markierung des Gegenchromosoms mit einem *hs-Myc* Konstrukt ermöglicht die Identifizierung der mutanten Zellen (B). Der Verlust von *klötzchen* führt zu einem Verlust von α -Spectrin (C, D, Pfeil). Dieser Phänotyp wird bei Verwendung der *eyFlp*-Technik besonders deutlich. Es entstehen sehr große mutante Bereiche, in den α -Spectrin fehlt (E, F, Pfeil). Durch den Verlust von α -Spectrin in der Augenscheibe ist die α -Spectrin Expression der Gliazellen gut erkennbar, die nicht mutant für *klötzchen* sind (F, Pfeil).

Ergebnisse

Zellen erfolgte anhand der Expression eines membrangebundenen Myc-Proteins auf dem Wildtyp-Chromosom. Die unterschiedlichen Expressionslevel ermöglichen eine eindeutige Unterscheidung zwischen *klötzchen* mutanten Zellen, dem wildtypischen Zwillings-Klon und heterozygotem Gewebe. *klötzchen* mutante Zellklone exprimieren deutlich verminderte α -Spectrin Proteinmengen (Abb. 13 D, Pfeil).

Deutlicher wurde das Ergebnis bei Verwendung der *eyFlp*-Technik. Hier ist das *Flipase*-Gen unter der Kontrolle des *eyeless*-Promotors, so dass die Expression der *Flipase* am Ende der Embryogenese in allen Zellen der Augenimaginalscheibe beginnt. Zudem sorgt ein *Minute* Gen auf dem Gegenchromosom für einen Entwicklungsvorteil der *klötzchen* mutanten Zellen; der Anteil *klötzchen* mutanter Zellen im Vergleich zu heterozygoten Zellen wird deutlich größer. Die Zellen des Zwillings-Klon sterben während der Entwicklung (Newsome et al., 2000). Generiert man *klötzchen* mutante Augenscheiben mit dieser Methode, so verliert man die α -Spectrin Expression in großen Teilen (Abb. 13 E) bzw. nahezu vollständig in der Augenscheibe (Abb. 13 F).

Durch den Verlust der α -Spectrin Expression in der Peripodialmembran und in den Photorezeptoren ist zu erkennen, dass α -Spectrin auch in den Gliazellen der Augenscheibe exprimiert wird (Abb. 13 F, Pfeil). Die Gliazellen wandern erst während der larvalen Entwicklung aus den optischen Loben in die Augenscheibe ein und werden nicht innerhalb der Expressionsdomäne des *eyeless* Gens geboren. Somit sind die Gliazellen, ebenso wie der Bolwig-Nerv nicht mutant für *klötzchen*.

Es kommt sowohl in *klötzchen* mutanten Embryonen, als auch in *klötzchen* mutanten Zellklonen zu einem Verlust des α -Spectrin Proteins.

3.2.3.5.1 *klötzchen* wird für die Entwicklung des Auges benötigt

Das Komplexauge von *Drosophila* besteht aus ca. 800, sehr regelmäßig angeordneten Ommatidien (Abb. 14 A). Der Verlust von *klötzchen* und folglich der Verlust des α -Spectrin Proteins führt zu einer Störung der Struktur des Auges. Zum Vergleich sind unterschiedlich große *klötzchen* mutante Augen-Klone dargestellt, die durch die Verwendung der *hsFlp*- bzw. der *eyFlp*-Methode mit einem *Minute* markierten Gegenchromosom erzeugt wurden (Abb. 14 B-F). Das Gegenchromosom ist zusätzlich *white*⁺ markiert, so dass klonales Gewebe (*white*⁻) anhand der Augenfarbe von heterozygotem Gewebe unterschieden werden konnte.

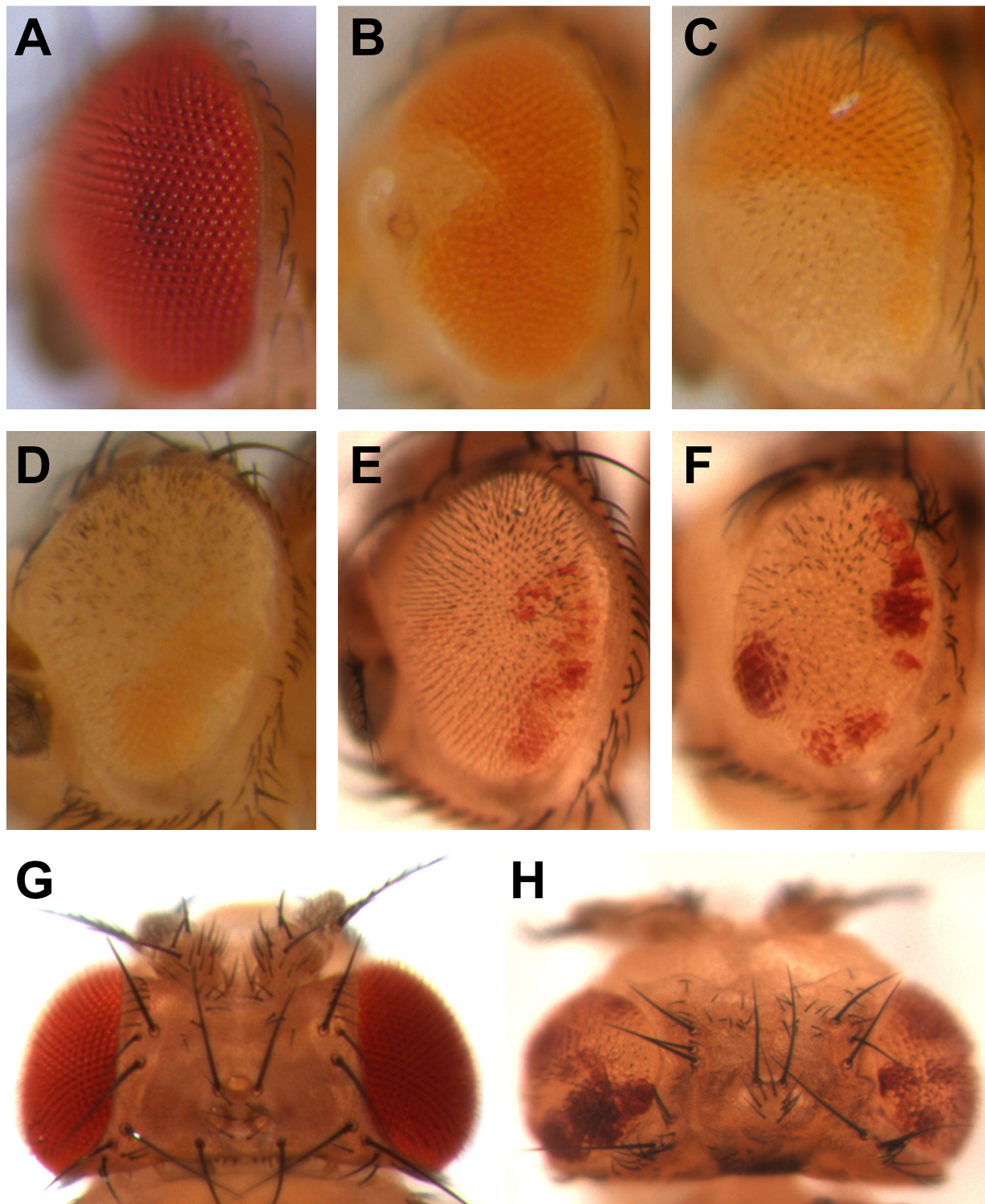


Abb. 14 Adulte *klötzchen* Phänotypen I. Die Induktion von *klötzchen* Klonen in der Augenimaginalscheibe führt zu einer Störung der Augenentwicklung. Die mutanten Augenzellen sind weiß, wildtypische Zellen rot bzw. orange. (A-F) Laterale Ansicht eines Komplexauges, anterior ist links. (G, H) Aufsicht auf die dorsale Kopfregion, anterior ist oben. (A, G) Wildtyp; (B, C) *hsFlp klo^{E2-66}*; (D) *hsFlp klo^{D4-65}*; (E) *eyFlp klo^{D4-65}*; (F, H) *eyF klo^{E2-66}*. Der Verlust von *klötzchen* in der Augenimaginalscheibe führt zu einem rauhen Augenphänotyp. In den mutanten Bereichen kommt es teilweise zur Ausbildung kutikulärer Strukturen (B). Besonders bei der Verwendung der *eyFlp*-Technik ist zu erkennen, dass die Mutation *klo^{E2-66}* zu einem stärkeren Phänotyp führt als die Mutation *klo^{D4-65}*. Der Verlust von *klötzchen* im dorsalen Kopfbereich führt zu einem Verlust der regelmäßigen Anordnung der Borsten (Vergleich G und H).

Ergebnisse

hsFlp induzierte Klone der Mutation *klo*^{E2-66} führen zu einer Störung der regelmäßigen Anordnung der Ommatidien. Je nach Lokalisation des klonalen Bereiches kann es zur Entstehung von Kutikulastrukturen innerhalb des Auges kommen (Abb. 14 B). Augenkclone des Allels *klo*^{D4-65} führen ebenfalls zu einer Unordnung der Ommatidien, die aber nicht ganz so stark ausgeprägt ist, wie bei *klo*^{E2-66} (Abb. 14 D). Die Unterschiede hinsichtlich der Stärke des rauhen Augenphänotyps der beiden *klötzchen* Allele wurden besonders deutlich bei der Verwendung der *eyFlp* Technik. Bei *klo*^{D4-65} gibt es nur sehr kleine heterozygote Bereiche (*white*⁺), während bei *klo*^{E2-66} dieser Anteil etwas größer ist. Das bedeutet, dass die *klo*^{E2-66} mutanten Zellen nicht mehr über einen wesentlichen Wachstumsvorteil gegenüber den heterozygoten *Minute*⁻ Zellen verfügen (Abb. 14 E, F).

Zusätzlich zur Beeinträchtigung der Augenentwicklung führt der Verlust von *klötzchen* (*eyFLP; klo*^{E2-66}) auch zu einer Störung der Entwicklung der Gewebe des dorsalen Kopfbereiches. Es kommt zum Verlust bzw. der Fehlpositionierung einzelner Borsten; die stereotype Anordnung der Borsten geht verloren (Abb. G, H). Es wurden auch noch deutlich stärkere Fehlentwicklungen der dorsalen Kopfregion als der hier gezeigte Phänotyp beobachtet. Ein wesentliches Problem bei der Beurteilung dieser Phänotypen ist, dass die klonalen Grenzen nicht markiert waren und somit nicht zwischen *klötzchen* mutantern und heterozygotem Gewebe unterschieden werden konnte.

3.2.3.5.2 *klötzchen* wird für die Entwicklung weiterer adulter Gewebe benötigt

Mit der *hsFlp* Technik werden *klötzchen* mutante Zellklone nicht nur im Auge, sondern auch in anderen adulten Geweben induziert. Die Auswirkungen des Verlustes von *klötzchen* für die Entwicklung des Thorax bzw. der Flügel konnten so untersucht werden (Abb.15). Auch diese Klone sind mit einem *Minute* markierten Gegenchromosom erzeugt worden, so dass die *klötzchen* mutanten Zellklone relativ groß sind. Der Verlust von *klötzchen* in thorakalem Gewebe führt zu einer Reduktion der Größe und Anzahl der Makro- und Mikrochaeten. Vereinzelt kommt es zu einem Verlust der Makrochaeten. Die *klötzchen* mutanten Mikrochaeten sind deutlich kleiner als die Wildtyp-Mikrochaeten und zeigen einen Verlust der Orientierung und der strengen Ordnung ihrer Positionen (vergleiche Abb. 15 A mit C, Pfeile). Diese Phänotypen konnten bislang nur bei Klonen, die mit dem Allel *klo*^{E2-66} induziert wurden, beobachtet werden. *klo*^{D4-65} führt allerdings auch zu einem deutlich schwächeren Augenphänotyp.

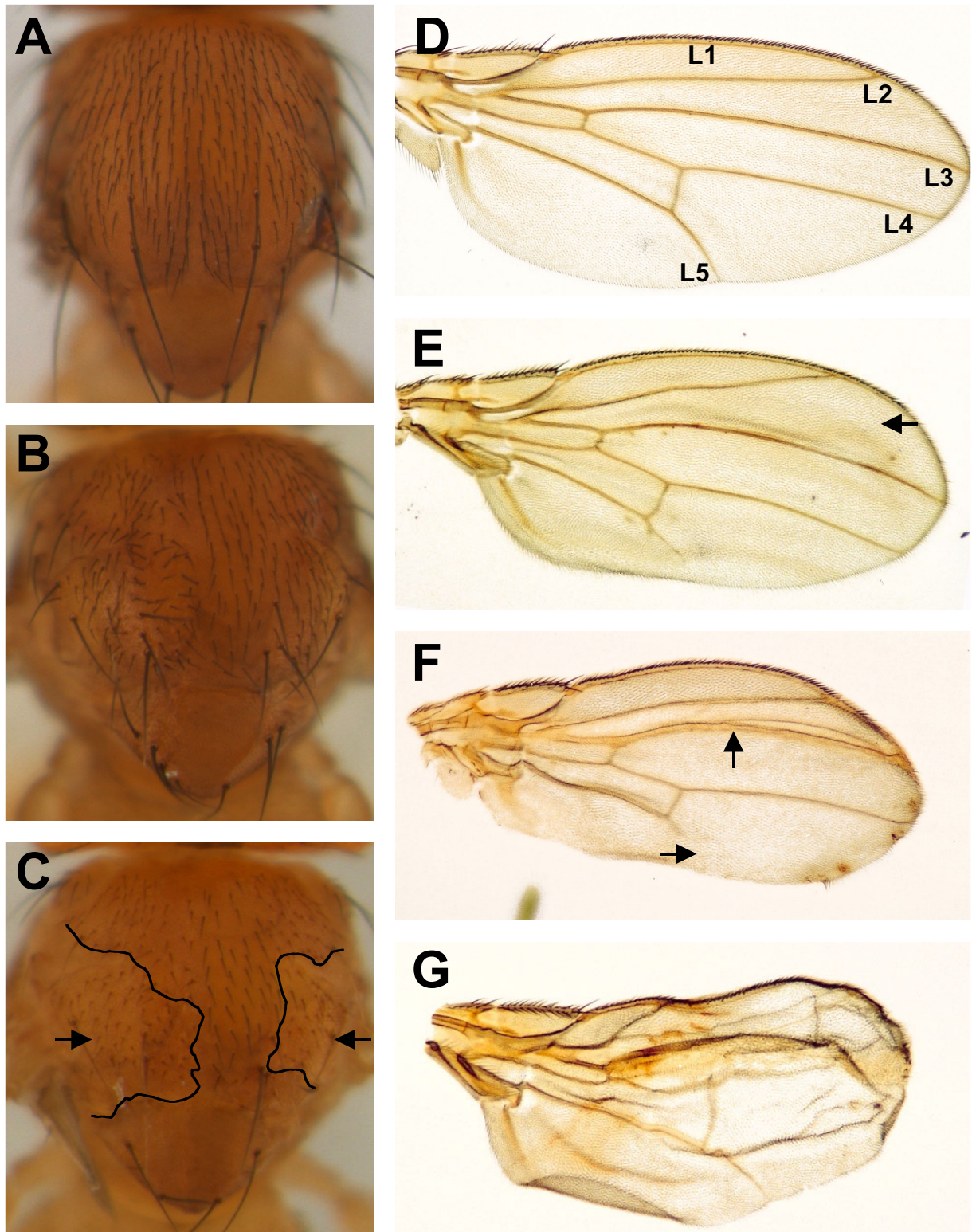


Abb. 15 Adulte *klötzchen* Phänotypen II. Analyse des Verlustes von *klötzchen* für die Thorax- und Flügelentwicklung. (A-C) Dorsale Ansicht des Thorax, anterior ist oben; (D-G) Präparation der Flügel, anterior ist oben. (A, D) Wildtyp; (B, C, F, G) *hsFlp klo^{E2-66}*, (E) *hsFlp klo^{D4-65}*. Der Verlust von *klötzchen* in den proximalen Bereichen der Flügelimaginalscheibe, die später den Thorax bilden, führt zu einem charakteristischen Phänotyp. In den klonalen Bereichen, die *yellow*-markiert sind (eingezeichnet in C), kommt es zu einem Verlust von Macrochaeten. Die Microchaeten sind deutlich kleiner als die wildtypischen Borsten und nicht mehr regelmäßig angeordnet (C, Pfeile). In den Flügeln waren die klonalen Grenzen nicht eindeutig zu erkennen. Der Verlust von *klötzchen* im Flügel führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Phänotypen. Es kommt sowohl zu einem Verlust von Flügelvenen (E, F) als auch zu einer Verdickung von Flügelvenen (F). Große *klötzchen* Klone führen zu einer Blasenbildung in den Flügeln (G).

Der Verlust von *klötzchen* während der Flügelentwicklung führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Phänotypen. Es kommt sowohl zum Verlust von Flügelvenen (L5 in Abb. 15 E und F) als auch zu einer Verdickung von Flügelvenen (Abb. 15 F). Zugleich ist eine starke Verkleinerung einzelner Flügel-Kompartimente, z. B. des Bereiches zwischen L2 und L3 und des Bereiches posterior von L5 (Abb. 15 F), zu beobachten. Große *klötzchen* Klone des Allels *klo*^{E2-66} führen häufig zu „Blasen“ innerhalb der Flügel (Abb. 15 G). Hier ist entweder die Adhäsion oder die Größenverteilung zwischen dorsalem und ventralem Flügelbereich gestört. Genauere Rückschlüsse auf eine Funktion von *klötzchen* während der Flügelentwicklung waren möglich, da die Grenzen der mutanten Zellklone nicht eindeutig zu erkennen waren. Die Analyse muß noch einmal wiederholt werden, um präzise Aussagen hinsichtlich der Zellautonomie und der exakten Funktion von *klötzchen* für die Flügelentwicklung treffen zu können.

3.2.3.6 *klötzchen* betrifft die Expression der α -spectrin mRNA

Die Analyse des Verlustes von *klötzchen* während der Larvalentwicklung hat noch einmal die Diskrepanz zwischen den genetischen und phänotypischen Daten der embryonalen Analyse bestätigt. *klötzchen* betrifft die α -Spectrin Expression sowohl im Embryo als auch in larvalen Zellklonen; der embryonale *klötzchen* Phänotyp unterscheidet sich aber vom α -spectrin Phänotyp. Deshalb wurde untersucht, ob *klötzchen* möglicherweise nicht nur die α -Spectrin Proteinmenge sondern auch die Expression der α -spectrin mRNA betrifft.

Um die Probleme des Einflusses der maternalen Komponente zu umgehen, wurden wiederum larvale mutante Zellklone für die Analyse genutzt. Für die Analyse eignet sich besonders die Augenheimagscheibe, da mit der *eyFlp*-Technik die Generierung großer mutanter Zellklone möglich ist. Im Wildtyp findet man eine starke Expression der α -spectrin mRNA in allen Photorezeptorzellen hinter der morphogenetischen Furche. Im posterioren Teil der Augenheimagscheibe, in dem die Differenzierung der Photorezeptoren weiter fortgeschritten ist, geht die Expression zurück und nur noch geringe α -spectrin mRNA Level sind nachweisbar (Abb. 16 A). In *klötzchen* mutanten Zellklonen kommt es zum Verlust eines Großteils der α -spectrin mRNA. Es wurden mehr als 10 Augenscheiben beider *klötzchen* Allele analysiert und immer sind große Bereiche innerhalb der Augenscheibe zu erkennen, die keine oder kaum α -spectrin mRNA aufweisen (Abb. 16 B, Pfeil). Hinsichtlich der Größe und Verteilung entsprechen die α -spectrin mRNA-freien Bereiche in etwa den mutanten Zellklonen, die mit dem anti- α -Spectrin Antikörper analysiert wurden (Abb. 13 E).

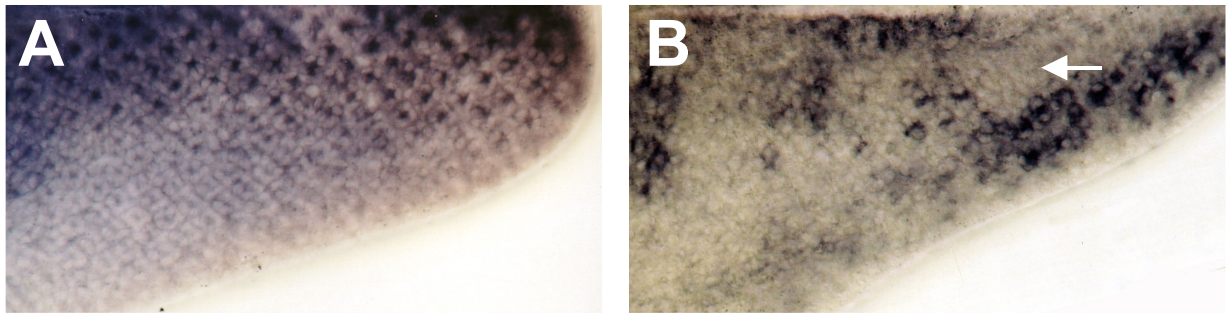


Abb. 16 *klötzchen* führt zu einem Verlust der α -spectrin mRNA. Präparationen von Augenimaginalscheiben, anterior ist oben. (A) Wildtyp, (B) *eyFlp klö^{E2-66}*. Analyse der α -spectrin mRNA Expression in wildtypischen und *klötzchen* mutanten Augenimaginalscheiben. Die Hybridisierung mit einer *anti-sense* α -spectrin Sonde zeigt eine starke Expression von α -spectrin in allen Photorezeptorzellen hinter der morphogenetischen Furche (A). Im posterioren Bereich der Scheibe kommt es nur zu einer schwachen α -spectrin Expression. *klötzchen* mutante Augenklone wurden mit der *eyFlp*-Technik induziert. In den *klötzchen* mutanten Zellen kommt es zu einem Verlust der α -spectrin mRNA (B, Pfeil). Der gleiche Phänotyp konnte bei mutanten Zellklonen der Mutation *klo^{D4-65}* nachgewiesen werden.

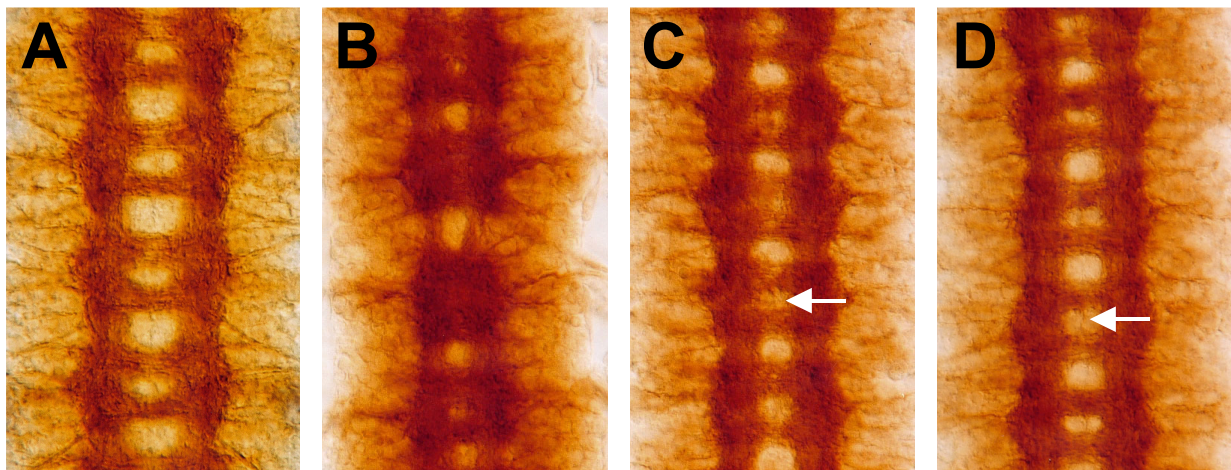


Abb. 17 Rettung des *klötzchen* ZNS-Phänotyps. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. (A) Wildtyp; (B) *klo^{E2-26}/klo^{D4-65}*; (C) *klo^{E2-66} sim-GAL4/klo^{D4-65} UAS-CG32315²*; (D) *klo^{E2-66} rho-GAL4/klo^{D4-65} UAS-CG32315²*. Der *klötzchen* ZNS-Phänotyp läßt sich durch eine Expression von *CG32315* im Hintergrund der *klötzchen* Mutationen partiell revertieren. Sowohl die Expression mit *sim-GAL4* (Mittellinie, C) als auch die Expression mit *rho-GAL4* (Neuroektoderm und Mittellinie, D) führt zu einer deutlichen Abschwächung des *klötzchen* Phänotyps. In beiden Fällen ist die Trennung der Kommissuren wieder klar erkennbar.

Ergebnisse

In *klötzchen* mutanten Zellklonen kommt es somit zu einem Verlust sowohl des α -Spectrin Proteins als auch der α -spectrin mRNA. Das bedeutet, dass es sich bei den *klötzchen* Allelen nicht um reine Punktmutationen innerhalb des α -spectrin Gens handeln kann, da es dann nicht zu einem Verlust der α -spectrin mRNA kommen sollte. *klötzchen* könnte von dem Gen *CG32315* kodiert werden, das dann direkt für die Regulation der α -spectrin mRNA Menge verantwortlich wäre.

3.2.4 Analyse des Gens *CG32315*

Um zu untersuchen, ob *CG32315* für *klötzchen* kodiert, wurden zwei experimentelle Ansätze durchgeführt: Es wurde ein UAS-*CG32315* Konstrukt hergestellt, mit dem der mutante *klötzchen* Phänotyp gerettet werden sollte. Zudem wurde der Bereich des offenen Leserasters von *CG32315* in den verschiedenen *klötzchen* EMS-Allelen auf Punktmutationen und daraus resultierenden Aminosäure-Austauschen des Proteins untersucht.

3.2.4.1 Rettung des *klötzchen* Phänotyps durch *CG32315*

Die cDNA *LD18420* des Gens *CG32315* wurde direktional über eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen *KpnI* (*Asp718*) und *NotI* in den Vektor pUAST kloniert. Die Klonierung wurde sowohl mit Testrestriktionen als auch durch die Sequenzierung des Konstruktes bestätigt. Transgene Fliegen des UAS-*CG32315*-Konstruktes wurden nach einem Standardprotokoll hergestellt (siehe Material und Methoden). Es konnten 9 unabhängige transgene Stämme isoliert werden. Zunächst wurde getestet, ob die ektopische Expression des Proteins mit verschiedenen GAL4-Treiberlinien zur Letalität oder zu einem dominanten Phänotyp führt. Bei Expression zweier Kopien von UAS-*CG32315* (UAS-*CG32315*⁴⁺⁷) mit *breathless*-GAL4, *Krüppel*-GAL4 oder *dpp*-GAL4 kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Lebensfähigkeit. Es schlüpfen nur noch sehr wenige Tiere des entsprechenden Genotyps, die aber keine adulten Phänotypen zeigten. Ein dominanter, adulter Phänotyp konnte nur mit der Treiberlinie *pannier*-GAL4 erzeugt werden. Es kommt zu einer Beeinträchtigung des thorakalen Schlusses; die Mikrochaeten entlang der dorsalen Mittellinie sind weiter voneinander getrennt als im Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Dieser dominante Phänotyp wurde genutzt, um eine mögliche genetische Interaktion zwischen der ektopischen Expression von *CG32315* und den *klötzchen* bzw. α -spectrin Mutationen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass eine weitere Erhöhung der Dosis (3 Kopien) von *CG32315* innerhalb der *pannier*-Expressionsdomäne zur Letalität führt und

Ergebnisse

dass sich der ektopische Phänotyp sowohl durch die Reduktion der *klötzchen* als auch der α -spectrin Dosis abschwächen läßt (T. Stork, 2002). Es gibt somit eine direkte, genetische Interaktion zwischen *CG32315* und den *klötzchen* bzw. α -spectrin Allelen.

Da die ektopische Expression des Transkriptes *CG32315* nicht zu einem embryonalen Phänotyp führt, wurde versucht, den ZNS-Phänotyp von *klötzchen* mutanten Embryonen durch die Expression von *CG32315* im Nervensystem zu retten. Hierfür wurden rekombinante Chromosomen der Allele *klo*^{D4-65} und *klo*^{E2-26} mit drittchromosomalen UAS-*CG32315* Insertionen hergestellt. Gleichzeitig wurden Rekombinanten zwischen den *klötzchen* Allelen und den drittchromosomalen GAL4-Insertionen *sim*-GAL4 (Mittellinie), *rho*-GAL4 (Neuroektoderm und ML-Gliazellen) und *da*-GAL4 (ubiquitäre Expression) generiert. Die Kreuzung der entsprechenden Stämme gegeneinander führt zu einer ektopischen Expression von *CG32315* in entsprechenden Geweben in *klötzchen* mutanten Embryonen. Die *klötzchen* Letalität konnte nicht durch die ubiquitäre Expression des Gens *CG32315* revertiert werden. Der fusionierte Kommissurenphänotyp der Kombination *klo*^{D4-65}/*klo*^{E2-26} konnte hingegen durch eine Expression von *CG32315* mit den Treibern *rho*-GAL4 bzw. *sim*-GAL4 partiell gerettet werden (Vergleiche Abb. 17 B mit C, D). Das ZNS der resultierenden Embryonen ist nicht vollständig wildtypisch, es kommt jedoch nicht mehr zu einer Fusion der Kommissuren und der Abstand der Konnektive entspricht in etwa dem Wildtyp.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob neben der phänotypischen Rettung auch eine Rettung der α -Spectrin Protein Level in *klötzchen* mutanten Embryonen möglich ist. Die Verwendung der gleichen genetischen Kombination wie bei der phänotypischen Rettung führte zu keinen eindeutigen Resultaten, da auch in *klötzchen* mutanten Embryonen, in denen *CG32315* nicht ektopisch exprimiert wird, immer noch eine Restexpression von α -Spectrin in Mittellinienzellen zu beobachten ist (siehe Abb. 10 D). Es konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob das α -Spectrin Protein in den entsprechenden Embryonen durch die Expression von *CG32315* induziert wurde. Die Analyse wurde zusätzlich mit einem *slit*-GAL4 Treiber vorgenommen, der neben der Expression in den ML-Gliazellen auch die Expression in den Oenocyten ermöglicht. Hier konnte keine Rettung der α -Spectrin Protein Level beobachtet werden, allerdings setzt die Expression in den Oenocyten auch erst relativ spät in der Entwicklung ein. Momentan werden rekombinante Chromosomen der verschiedenen *klötzchen* Allelen mit der Treiberlinie *en*-GAL4 hergestellt, die die Expression in früheren Stadien der Entwicklung in einem leicht analysierbaren Muster ermöglicht (siehe Abb. 21).

Ergebnisse

Zudem werden Stämme etabliert, die die Expression größerer Mengen des *CG32315* Transkriptes erlauben.

3.2.4.2 Sequenzanalyse der *klötzchen* Mutationen

Zur Analyse der translatierten Sequenzen von *CG32315* in *klötzchen* mutanten Embryonen wurden die *klötzchen* EMS-Allele auf ein GFP-markiertes Balancerchromosom umbalanciert. Der GFP-markierte Balancer erlaubt die Selektion von lebenden, homozygot mutanten *klötzchen* Embryonen am Ende der Embryogenese. Jeweils 5 mutante Embryonen wurden zur DNA-Präparation eingesetzt. Der ORF des Gens *CG32315* wurde in zwei überlappenden PCR-Fragmenten amplifiziert und anschließend in einen geeigneten Vektor kloniert. Mit Hilfe der entsprechenden Primer wurde der ORF des Gens *CG32314* in den beiden *klötzchen* Allelen *klo*^{D4-65} und *klo*^{E2-26} in beiden Richtungen (5'-3' und 3'-5') sequenziert (siehe Anhang). Für beide Mutationen konnten spezifische Basenaustausche nachgewiesen werden, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins *CG32315* führen. Die Basenaustausche wurden in einer zweiten unabhängigen PCR-Reaktion mit anschließender Klonierung und Sequenzierung bestätigt, um PCR-Artefakte auszuschließen.

3.2.4.3 Analyse der Aminosäuresequenz des *CG32315* Proteins

Das Gen *CG32315* kodiert für ein 1240 Aminosäuren großes Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von ca. 120 kDa. Es ist evolutionär konserviert; in den Datenbanken finden sich ein Homolog von *Anopheles gambiae* und ein humanes Homolog. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen ist in Abbildung 18 dargestellt. Es ist zu beachten, dass es sich bei dem *Anopheles* Homolog wahrscheinlich nur um ein Fragment des Proteins handelt, da die Annotation des *Anopheles* Genoms gerade erst begonnen hat. Die größten Übereinstimmungen finden sich im Bereich der Aminosäuren 300-645. Innerhalb dieses Bereiches sind mehr als 30% der Aminosäuren der 3 Proteine identisch und bis zu 50% der Aminosäuren konserviert. Mit Hilfe verschiedener Proteinanalyse-Programme des BDGP (www.fruitfly.org) konnte eine konservierte Proteindomäne nachgewiesen werden. Die Aminosäuren 1087-1097 entsprechen einer sogenannten RCC1 Domäne, die bei einigen Guanidinnukleotid-Austauschfaktoren vorkommt. Diese Domäne ermöglicht keine genauere Aussage über eine Funktion des Proteins, da der Konservierungsgrad nicht sehr hoch ist und eine funktionelle Beschreibung nur für Proteine existiert, die eine 2-5 RCC-Domänen

1 M T A E L K A S D T E M T K P E E R H L L Q L L A Q L E K V P H H Q L E Q K F V A Y F K K V K G K Q D N Q S N C T L E D F A T Y F L G A L R Q S T K R Y Y S Q N S E T P V F P L T P Drosophila K1o
2 M A A V L E S - - - - - L L R E E V S V A A - - - - - V V R W I A R S T Q S E Q P - - - - - G V P S R R L G S Human K1o
3 M P D E L - - - - - T Q L E S V T E - Anopheles K1o

91 I H Q K P P V A D V V K E E Q Q L W E S I L S R S C S M S T S N T J P A P Q P Q G R R S T P S G A Q F C S T P N R S G G G A G G G H S T C T G N F L V N T P I Q S Drosophila K1o
43 P R Y R V R L S H A G D G Y H E G S G E S V I R A R R S A V E R Q D G R T K P - - - - - S R R I N P T P V S E - - - - - E R S - - - - - L S K P K T C F - - - - - T S P P I S C Human K1o
14 - Anopheles K1o

181 H O R S K K K I T P Q K Q Q N Q H A S L L G S G T - G A G A T P O S K P R R R V L P M T I S K N V S A S S F G D T S S F S N E N F W R T S Q S E I F D R S Q E A A L E M E A R Drosophila K1o
113 V P S S - - - - - Q P S A L D T S P M G G L P P C C R S - - - - - L Q E E R E M L R K E R Y G L A A - - - - - P C D T G F L A V G - - - - - D L Q S Human K1o
25 - Anopheles K1o

270 K F L L L K K Q E I K S E A P V N V S Q Q E R T P E D E V F P E E A I S L E G V A N A N H Q L L S T I Y S L L M D L N L V P N L R E L S F V V H L L N V R D F - - - - - G Q S P V K S Drosophila K1o
169 K Q L Q Q S P I P T C P T P E L G S P L P S R T - - - - - G S L T D E P A D P A R V S S R O L L E V A L Y S S G I A E N L V P N L E L F F V Q L L T A R R V E T A K D S D P E Human K1o
25 - - - - - I E F D N V T Q S T I D R L V A T Y A L L M D L N L V P N L N E L A Y I N L V S T E R Y Y I - A Q D A Q K L Anopheles K1o

358 Y V P S A L E G - - - - - L T Q H S C V Y F A A K L E N Q K L L L Q L D K R T L S V L L Q N E R L S L L P Q G V V Q E L E T H C Q R R Q D S T T P P F A M D T S Drosophila K1o
256 L S P A V L D S L E - - - - - S P L F O S I H D C V F A V Q V L E C H E Q V L S N L D K G T L K L A E N E R L C E S P A L Q G R L R A - - - - - A Y E G S Human K1o
80 L E A T S A G T D N G T G R A E L S N V L R S P H N C V Y F A A E V L H S Q R T Q L A L L D S L S L R V V V E N E Q L G V L H P T L N G F L R D M L Q K M K L E N A F I S S Q Q G Anopheles K1o

435 S S S S Q - - - - - N V Y Y H V E N D S R D N F P S Q N E F G A F K S Q R D L F Y K A L K R W E V S H L N R G F N F P S E L G P R I M D I Y K K E H P N M T H L A K L F V Drosophila K1o
326 V A K V S L V M P P S T Q A V S F Q P E T D N R A N F S S D R A F H T F K K Q R A M - - - - - M Q L S A A - - - - - C S H S H F V R L F O Human K1o
170 T C G G D L V P N S S I T N V F Y Q E N D T K D F P S S K E F N A M K O R D I F Y A T L R T W E T E H L N P A W E F E T K G T K V R A M L I L H P I N M S H L A K L F S Anopheles K1o

517 N Q L L - - - - - I S A T E T T E S P E L G L K L D P L - - - - - R H N K L A Q R L V T S S S - S V E G Q - - - - - F P R S Q A F F R D F I A V C S S V A - F L V H L K L E L F V Q Drosophila K1o
366 K Q L Q M C Q S P G A G G T V L G E A P D V L S M - L G A D K L G L M Q L R E L M A P S S G G P C P P T F P G C Q F F R D I L S A M S F Q - F N Q H L M D S L S L K Human K1o
380 A Q L I - - - - - I S - F N F D N S A S E L O M A L P I D L T K L S K L R Q L M A P S I F S T Q Y L - - - - - F P G S Q M F F R D F I V A S E N H Q I F I E Q L K A V L I H E Anopheles K1o

591 L R N M D S T F D L L Q L T D D V A V E E Q S - - - - - A Q G P Y I V R V Q T M A N M L I A K F L G Y V T V M P F S G T T Q H G N P T P P Y L C P Q Q L L R N H F R - - - - - Drosophila K1o
474 I Q E L N G L A L P O H E P N D D G E S D V D M Q G E R K Q F A V - - - - - V L L S I R L L A K F L G F V A F P Y R G P E P - - - - - P P T G E L Q D S I L A L R S Q V N G R G I L V P Human K1o
338 L L Q M D S S T Y D V F N I S D A - - - - - E N - - - - - S N R S E Y V V R I - Anopheles K1o

672 P D F N L R E I T L E R S M R Q K L I T L P W L V Q Y L A M L D V S L H L P D A V A T L E L L Y G L Y A D I T R M A K L Q P A A V F I A R - - - - - S C G W L L D A Q P Q L V N Drosophila K1o
558 P V E D V R T L L Q R G L Q A R R A V L T V P W L V E F L S F A D H V P L L E Y Y R D I F T L L L R L H R S V L S Q E S E G M C F L N K L L L L A V L G W L F Q I P T V P E D Human K1o
366 - Anopheles K1o

757 G Y Y N Y R A Q E A G V G S I S A I V D I C L K D L S C H D K S H A P L D E - L L P V A C P I Q E F R V S I T P S R Q - A K S G R F R Y I - - - - - T T R L E Q L Q O N S Drosophila K1o
648 L F F - - - - - L E E G P S Y A F E V D T V A P E - - - - - H G L D N A P V D Q L L Y T C P Y I G R G E G S G T E N L D F T D G E L R K L L A S W S G S G R S G G E F M R K I Human K1o
366 - Anopheles K1o

837 S S I S K D A I V A S E L S P A E Q Q R K L V D A Y L Q S Q N A S T R R L I E F V T E R T - F K C V - - - - - V K D A - - - - - Q Q E I L L P S K A S A D A K V E I K S T M L E E Drosophila K1o
730 T P T T T S L G A Q P S O T S Q L Q A Q L A Q A F E H N Q P P S L R R T V E F V A E R I G S N C V K H I K A T L V A D L V R Q A E S L L Q E L L V T Q G E E G G D P A O L L E I Human K1o
366 - Anopheles K1o

917 V F Q E L - - - - - H E I F F Q D A R E N A C Q R W K - E H V H Q M L D R R I E H S L D G L L P S S T N A V - - - - - L R S T Y A H I R V Q A Q T Q Q W L Q S S V L Q S Drosophila K1o
820 L C S Q L C P H G A Q A L A L G R E F - C O R K S P G A V R A L L P E E T P A A V R V L S A E N I A V G L A T E K A C A W L S A N I T A L I R R E V K A A V S R T L R A Q G P E P Human K1o
366 - Anopheles K1o

992 T F Y H G D L Q E - - - - - L A T K V C N C N R M K A D A A A G G G G S S E L Q L S P D I G F L S E F L Y Q L Q Q W L H C L S L - - - - - R P E Y V G S Q E D L A E L R K A Q Drosophila K1o
909 A - A R G E R R G C S R A S Q G D I S P C S S D V L S L A V G P R D P D E - G V S P E - - - - - H L E Q L G L Q G T L R C R O F L C P P A E Q H L A K C S V E L A S L L V A D Q I Human K1o
366 - Anopheles K1o

1073 A V L P K M P T V F Y H L I G S G L V H L L Q L L I T R K P N F L D K D I I S A S C V W R S Q L M D S K A S P I G I F D G L I S I S F V Q E M A N S - A D S F R M L E T I L R S Drosophila K1o
994 P I L G P P A Q - - - - - Y R L E R G Q A R L L H M L E L - - - - - S L W K - - - - - E D F Q G P V P L Q L L S P R N V G L L A D T R P R E W D L L L F L R E Human K1o
366 - Anopheles K1o

1162 V Q S G A T R A D H L N E L F M P L F A E N W S P K V W C M L S E L L Q Q L S L S G K D S E A H Y A S G D S P E D E A K S H L F W E M L A D L S R D L D N F Drosophila K1o
1060 V E K G L M G R M E I E A C L G S L H Q A Q M P G D - - - - - F A E E L A T L S - - - - - N L F L A E P H L P E Q L R A C E L V Q - - - - - P N R G T V L A Q - S Human K1o
366 - Anopheles K1o

Abb.18 Analyse der Klötzchen/CG32315 Protein Sequenz. Ein humanes und ein Fragment eines *Anopheles* Homolog konnten in den Datenbanken identifiziert werden. Die aus den Basenaustauschen resultierenden Aminosäureaustausche der *klötzchen* EMS-Allele sind farblich gekennzeichnet (*klö^{D4-63}* rot, *klö^{E2-26}* grün). Das Protein besitzt ein RCC1-Proteinmotiv (orange unterstrichen). Datenbank-Einträge: *Drosophila* Klötzchen/CG32315 = FBan0032315 (Flybase); Human K1o = Hs15_31084_30_72_5 (vorhergesagtes Gen, NCBI); *Anopheles* K1o = gb|EAA14322.1 (*Anopheles* Genom Blast, NCBI).

Ergebnisse

besitzen. In den Datenbanken sind ca. 65 weitere Proteine mit nur einer RCC-Domäne vorhanden, deren Funktion bisher nicht geklärt ist.

Die Aminosäure-Austausche der *klötzchen* Allele sind in Abbildung 18 eingezeichnet. Bei *klo*^{D4-65} kommt es zu einem Austausch des Serin 959 zu einem Alanin und bei *klo*^{E2-26} zu einem Austausch des Serin 425 zu einem Threonin und des Alanin 702 zu einem Threonin. Ob die betroffenen Aminosäuren konserviert sind, kann bisher aufgrund der unvollständigen Sequenz des *Anopheles* Homologs nicht geklärt werden. Zudem ist das Alignment der Sequenzen stark abhängig von den Parametern der verwendeten Software. Die bisherigen Datenbankanalysen lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des CG32315 Proteins zu.

3.2.4.4 Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen CG32315

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation des Proteins, wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Protein CG32315 generiert. Hierzu wurden zwei unterschiedliche GST-Fusionsproteine von CG32315 hergestellt. Ein N-terminales Fusionsprotein, das die Aminosäuren 12-557 des Proteins beinhaltet und ein C-terminales Fusionsprotein, das den Bereich 622-1124 umfaßt. Zur Generierung der GST-Fusionsproteine wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen mit Hilfe modifizierter Primer amplifiziert. Die Primer enthielten artifizielle Sequenzen, die eine direktionale, *in-Frame* Klonierung in den GST-Vektor pGEX-T4-1 (Amersham) ermöglichten.

Es wurden für beide Konstrukte mehrere Klone isoliert, die DNA präpariert und mit Hilfe von Testrestriktionen überprüft. Da es durch die PCR-Amplifizierung zu Basenaustauschen und somit zur Bildung trunkierter Fusionsproteine kommen kann, wurden mehrere unabhängige Klone getestet. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde in kleinem Maßstab mittels IPTG in BCL2 Bakterien induziert. Die Gesamt-Proteinextrakte wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Commassie-Färbung analysiert (Abb. 19). Für das N-terminale GST-CG32315-Fusionsprotein konnten 5 Klone isoliert werden, die nach der Induktion eine starke Proteinbande in der zu erwarteten Größe (93 kDa) zeigten (Klon 1, 2, 9, 10 und 11) (Abb. 19 A). Für das C-terminale GST-CG32315-Fusionsprotein konnten nur 2 positive Klone isoliert werden, die eine entsprechende Proteinbande (86 kDa) aufwiesen (Klon 24 und 29) (Abb. 19 B). Neben der Überprüfung der Klone durch eine Commassie-Färbung wurde auch ein Western-Blot der entsprechenden Gele durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mit

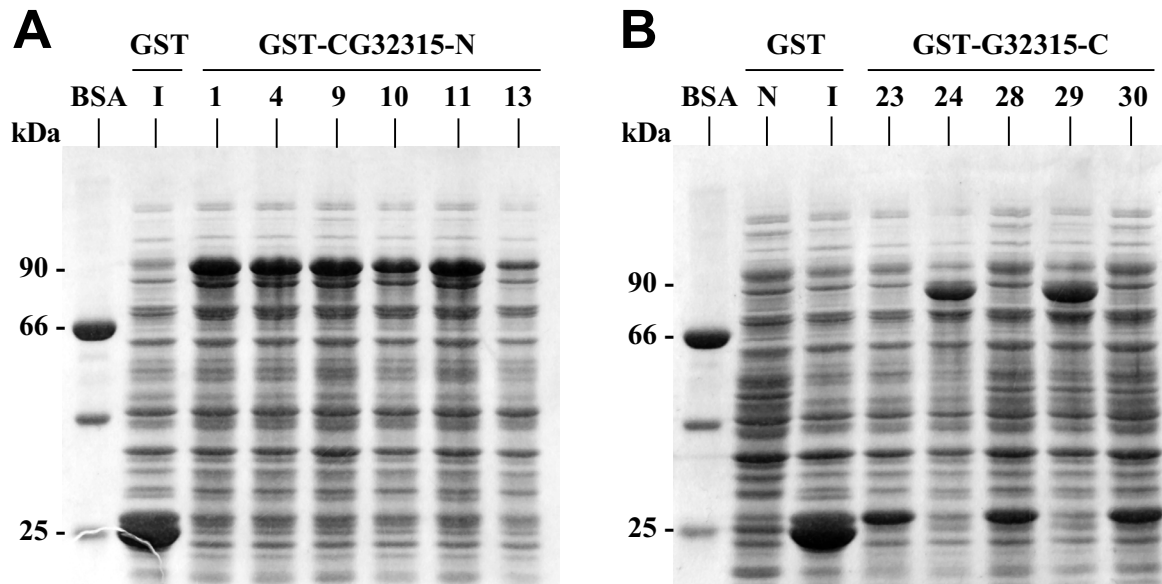


Abb. 19 Test der GST-CG32315-Fusionsproteine. Commassie-Färbungen von SDS-PAGE Analysen. Die Konstrukte der N- und C-terminalen GST-CG32315-Fusionsproteine wurden in einem kleinen Maßstab getestet. (A) GST-CG32315-N; (B) GST-CG32315-C. Als Größenmarker wurde BSA verwendet. Zum Vergleich wurde der Proteinextrakt eines induzierten (I) GST-Ausgangsvektor pQE30 (GST) aufgetragen. (A) 6 GST-CG32315-N Klone wurden auf eine Induktion des Fusionsproteins getestet. Nur Klon 13 zeigte keine Expression eines entsprechenden Fusionsproteins von ca. 90 kDa. (B) Bei dem Test der C-terminalen GST-CG32315-C Klone wurde zusätzlich ein nicht-induzierter (N) Klon des Ausgangsvektors aufgetragen um die Induktionseffizienz zu dokumentieren. Bei den Klonen 24 und 29 konnte ein GST-Fusionsprotein der erwarteten Größe von ca. 85 kDa nachgewiesen werden.

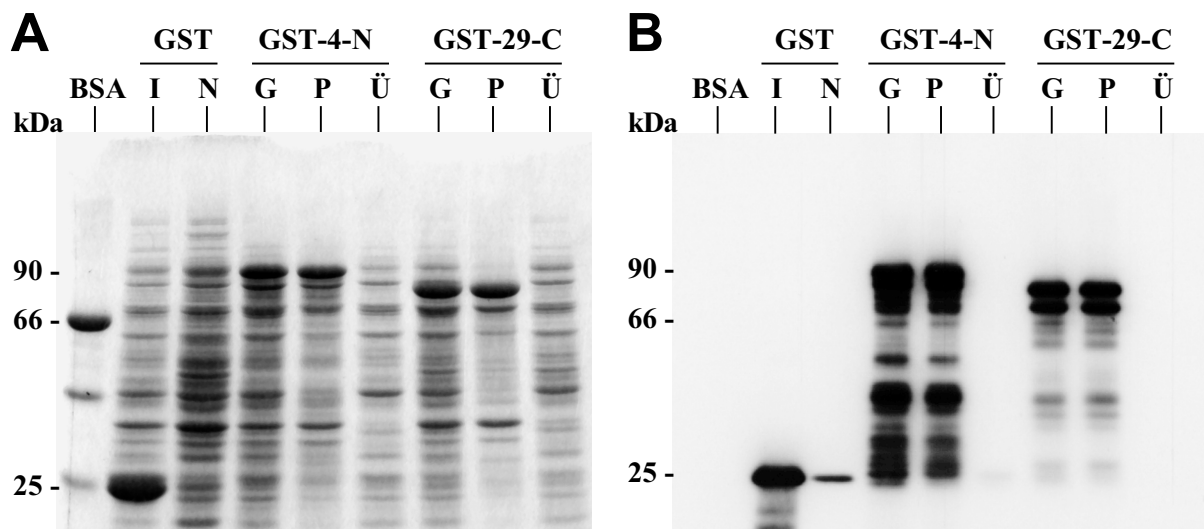


Abb. 20 Test auf Löslichkeit der GST-CG32315 Fusionsproteine. (A) Commassie-Färbung einer SDS-PAGE Analyse. (B) Immunhistochemischer Nachweis der GST-Fusionsproteine mit einem polyklonalen anti-GST Antikörper nach SDS-PAGE und Western Blot. Als Kontrolle wurde der Überstand des GST-Ausgangsvektors vor und nach einer Induktion mit IPTG aufgetragen. Die Analysen mit beiden Nachweismethoden führten zu dem gleichen Ergebnis. Die Fusionsproteine sind sowohl im Gesamtextrakt (G) und im unlöslichen Pellet (P), nicht aber im Überstand (Ü) nachweisbar. Beide GST-CG32315 Fusionsproteine sind unlöslich.

Ergebnisse

einem anti-GST Antikörper getestet. Der anti-GST Antikörper erkannte spezifisch die Banden der Fusionsproteine entsprechend den Befunden der Commassie-Gel Analyse (Daten nicht gezeigt).

Für alle weiteren Tests wurde Klon 4 des N-terminalen Fusionsproteins und Klon 29 des C-terminalen Fusionsproteins verwendet. Die beiden Fusionsproteine wurden nach Standardprotokollen auf ihre Löslichkeit getestet (siehe Material und Methoden). In Abbildung 20 ist sowohl die Analyse der Löslichkeit der Fusionsproteine im Commassie-Gel als auch der entsprechende Western Blot gezeigt. Sowohl im Commassie-Gel (Abb. 20 A) als auch im Western Blot (Abb. 20 B) ist deutlich zu erkennen, dass beide Fusionsproteine unlöslich sind. Die Präparationen wurden sowohl im kleinen als auch im großen Maßstab nach unterschiedlichen Protokollen (siehe Material und Methoden) durchgeführt. Die in Abbildung 20 gezeigten Ergebnisse stammen aus einer Präparation im großen Maßstab bei Raumtemperatur. Die Fusionsproteine konnten folglich nicht mit Glutathion aufgereinigt werden.

Zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers wurden jeweils ca. 2,5 mg der Proteinextrakte (Pellet-Fraktion) auf ein präparatives Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Commassie-H₂O gefärbt, um die entsprechende Proteinbande ausschneiden zu können. Ein Aliquot der ausgeschnittenen Bande wurde zur Kontrolle mit dem anti-GST Antikörper getestet. Für beide Fusionsproteine konnten die richtigen Banden isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Das Fusionsprotein/Polyacrylamid Gemisch, das ca. 0,7 mg des entsprechenden Fusionsproteins enthielt, wurde direkt zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (Davids Biotechnologie, Regensburg).

Die so gewonnenen Seren (CG32315-N und CG32315-C) wurden in verschiedenen Konzentrationen (von 1:100 – 1:10.000) an Wildtyp Embryonen getestet. Leider konnte für keines der Seren eine eindeutige immunhistochemische Reaktion nachgewiesen werden. Um die Spezifität der Seren zu testen, wurde das Gen *CG32315* ektopisch in verschiedenen Expressionsmustern exprimiert. Exemplarisch ist der immunhistochemische Nachweis an *en-GAL4/UAS-CG32315* Embryonen dargestellt (Abb. 21 A). Der anti-CG32315-N Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Der Antikörper erkennt das ektopisch exprimierte Protein sehr gut. Mit dem anti-CG32315-C Antikörper wurden etwas schlechtere Resultate erzielt (Daten nicht gezeigt). Das ektopisch exprimierte Protein ist im gesamten Zytoplasma der Zellen nachweisbar (Abb. 21 A, B).

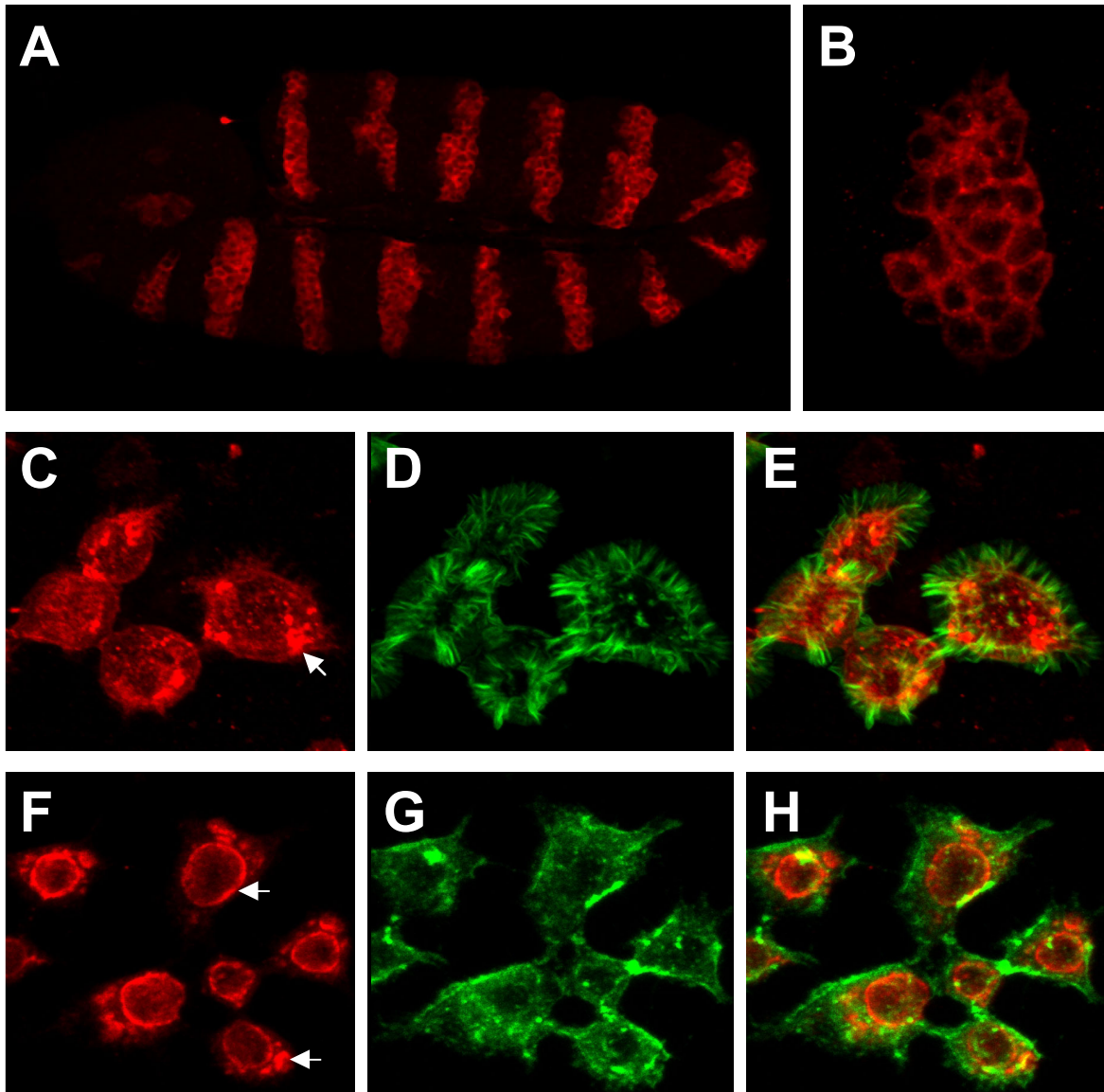


Abb. 21 Test der anti-CG32315 Testseren. Die anti-CG32315-N Seren wurden sowohl an *whole-mount* Embryonen (anterior ist links) (A, B) als auch an *Drosophila* Schneider (S2) Zellen getestet (C-H). Der anti-CG32315-N Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt (rot). Die Visualisierung des Zytoskeletts erfolgte über Phalloidin (Aktin-Zytoskelett (D, E, grün) und anti- α -Spectrin (Spectrin-Zytoskelett (G, H, grün)). Die Spezifität des Serums wurde durch eine Färbung an *whole-mount* Embryonen getestet, die das Gen *CG32315* im *en-GAL4* Muster exprimierten (*en-GAL4/UAS-CG32315⁴⁺*). Der Antikörper erkennt das ektopische Protein. Das Protein ist im gesamten Zytoplasma nachweisbar, nicht aber in den Zellkernen (A, B). Zur genaueren Bestimmung der subzellulären Proteinverteilung wurde das Serum an S2-Zellen getestet. Der Antikörper erkennt spezifisch das endogene CG32315 Protein. Das Protein ist im gesamten Zytoplasma nachweisbar. Eine Akkumulation des Proteins ist im Bereich um den Zellkern und in einzelnen Kompartimenten des Zytoplasma zu beobachten (C, F, Pfeile). Die Identität dieser Kompartimente konnte noch nicht geklärt werden. Es kommt zu keiner Kolo-kalisation mit den Zytoskelettmarkern (E, H).

Ergebnisse

Zur Analyse der endogenen Proteinverteilung wurden die Antikörper an *Drosophila* Schneider Zellen getestet (S2). Die Zellen sind für einen immunhistochemischen Nachweis leichter zugänglich. Zur besseren Beurteilung der subzellulären Lokalisation des Proteins wurden Doppelfärbungen mit dem Aktinzytoskeletts (Phalloidin) und dem Spectrin Zytoskelett (anti- α -Spectrin) durchgeführt. Für die beiden Färbungen wurden unterschiedliche Aliquots des CG32315-N Antikörpers eingesetzt. In beiden Ansätzen findet man eine zytoplasmatische Verteilung des Proteins. Besonders hohe Protein-konzentrationen sind entlang des Zellkerns und in punktierten Strukturen innerhalb des Zytoplasmas erkennbar (Abb. 21 C-H). Die genaue Identität dieser Strukturen konnte bisher nicht geklärt werden. Die Doppelfärbungen mit den Zytoskelettmarkern zeigen, dass das Protein CG32315 auch in allen Zellausläufern nachweisbar ist, allerdings findet man keine direkte Kolo-kalisation mit Aktin oder Spectrin. Auch in diesem Test zeigte der Antikörper CG32135-C deutlich schwächere Reaktionen. Der Nachweis des endogenen CG32315 Proteins in Embryonen konnte wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Spezifität der Antikörper bisher nicht erbracht werden. Möglicherweise werden auch nur sehr geringe Mengen des Proteins im Wildtyp exprimiert. Ähnliche Befunden konnten durch eine biochemische Analyse embryonaler Proteinextrakten erbracht werden. So erkennt der N-terminale Antikörper nur eine sehr schwache Bande in Wildtyp-Proteinextrakten; nach einer ektopischer Expression von *CG32315* mit *da*-GAL4 oder *en*-GAL4 läßt sich das Protein aber gut nachweisen (T. Stork, persönliche Mitteilung).

Alle bisherigen Experimente deuten darauf hin, dass das Protein CG32135 zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Regulation der α -spectrin mRNA Level fände somit nicht auf transkriptioneller, sondern auf posttranskriptioneller Ebene statt. Denkbar wäre z. B. die Regulation der Stabilität der α -spectrin mRNA durch CG32315.

3.2.5 Analyse von *CG32315* und α -spectrin durch RNA-interference

Seit einigen Jahren gibt es die Möglichkeit der Inaktivierung von Genen mit Hilfe der RNA-interference (*RNAi*)-Methode (Fire et al., 1998; Kennerdell et al., 1998). Weiterentwicklungen der ursprünglichen Methode ermöglichen es, einzelne Gene durch Nutzung des GAL4/UAS-Systems zellspezifisch auszuschalten. Die neuesten Vektoren verwenden ein Intron als „Spacer“ zwischen den gegenläufig ausgerichteten Sequenzen. In der Zielzelle kommt es zur Ausbildung von „loopless hairpin“ Doppelstrang RNA Produkten,

Ergebnisse

die durch einen enzymatischen Mechanismus die Zerstörung der äquivalenten, endogenen mRNA bewirkt (Kennerdell and Carthew, 2000; Carthew, 2001; Lee and Carthew, 2002).

Es wurden UAS-*RNAi* Konstrukte für α -spectrin und *CG32315* hergestellt, um die komplizierte genetische Situation der *klötzchen*/ α -spectrin-Region besser analysieren zu können und um die genaue Funktion des Transkriptes *CG32315* bestimmen zu können (Klonierungsschema siehe Abb. 22). Für die Analyse der beiden eng verknüpften Gene ist es besonders wichtig, dass die *RNA-interference* des einen Gens nicht auch Auswirkungen auf die mRNA Expression bzw. Stabilität des anderen Gens hat. In *C. elegans* und *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass mit Doppelstrang RNA Fragmenten, die gegen Intron-Sequenzen regulatorische oder 5'UTR Sequenzen eines Gens gerichtet sind, keine Beeinträchtigung der endogenen Genfunktion möglich ist (Fire et al., 1998; Kennerdell and Carthew, 1998). Da das Gen *CG32315* einem Intron von α -spectrin entspricht, sollte das Ausschalten des *CG32315* Gens keine Auswirkung auf die Expression oder Stabilität der α -spectrin mRNA haben (und umgekehrt). *RNAi* gegen *CG32315* sollte nur dann zu einer Reduktion des α -Spectrin Proteins oder der α -spectrin mRNA führen, wenn das Protein *CG32315* eine Funktion bei der Regulation der Stabilität oder Expression der α -spectrin mRNA hat.

Für beide Gene wurden beide möglichen Kombinationen (5'-3' Intron 3'5' (Forward) und (Reverse)) generiert, um mögliche Fehler beim Spleißen durch zusätzliche Spleiß-Donor bzw. -Akzeptor Sequenzen auszuschließen (Abb. 22). Von allen 4 Konstrukten (2 je Gen) wurden nach Standardmethoden transgene Fliegen hergestellt. Es konnten für jedes Konstrukt mindestens 6 unabhängige Insertionen isoliert werden.

Bislang konnten erst vorläufige Experimente mit den UAS-*RNAi* Konstrukten durchgeführt werden. Die ubiquitäre Expression mit *da*-GAL4 führt bei allen Stämmen zu Letalität. Allerdings sind die Letalitätsphasen bei den einzelnen Konstrukten sehr unterschiedlich. So führt die Expression der beiden α -spectrin Konstrukte zu früher larvaler Letalität (L1-L2), während die Expression einer Kopie der *CG32315* Konstrukte nur zu pupaler Letalität führt. Diese Unterschiede können auf eine unterschiedliche Stärke der transkriptionellen Aktivierung der UAS-Konstrukte (durch die Insertion in unterschiedliche chromosomale Bereiche) oder auf eine unterschiedliche Effektivität der *RNAi*-Konstrukte zurückzuführen sein. So sind verschiedene Gene unterschiedlich sensitiv bezüglich der Inaktivierung durch *RNAi* (Carthew, 2001). Nach der Erhöhung der Dosis (2 Kopien) konnte auch mit einem der *CG32315 RNAi*-Konstrukte larvale Letalität induziert werden. Bei der

PCR-Produkte mit artifiziiellen Restriktionsschnittstellen

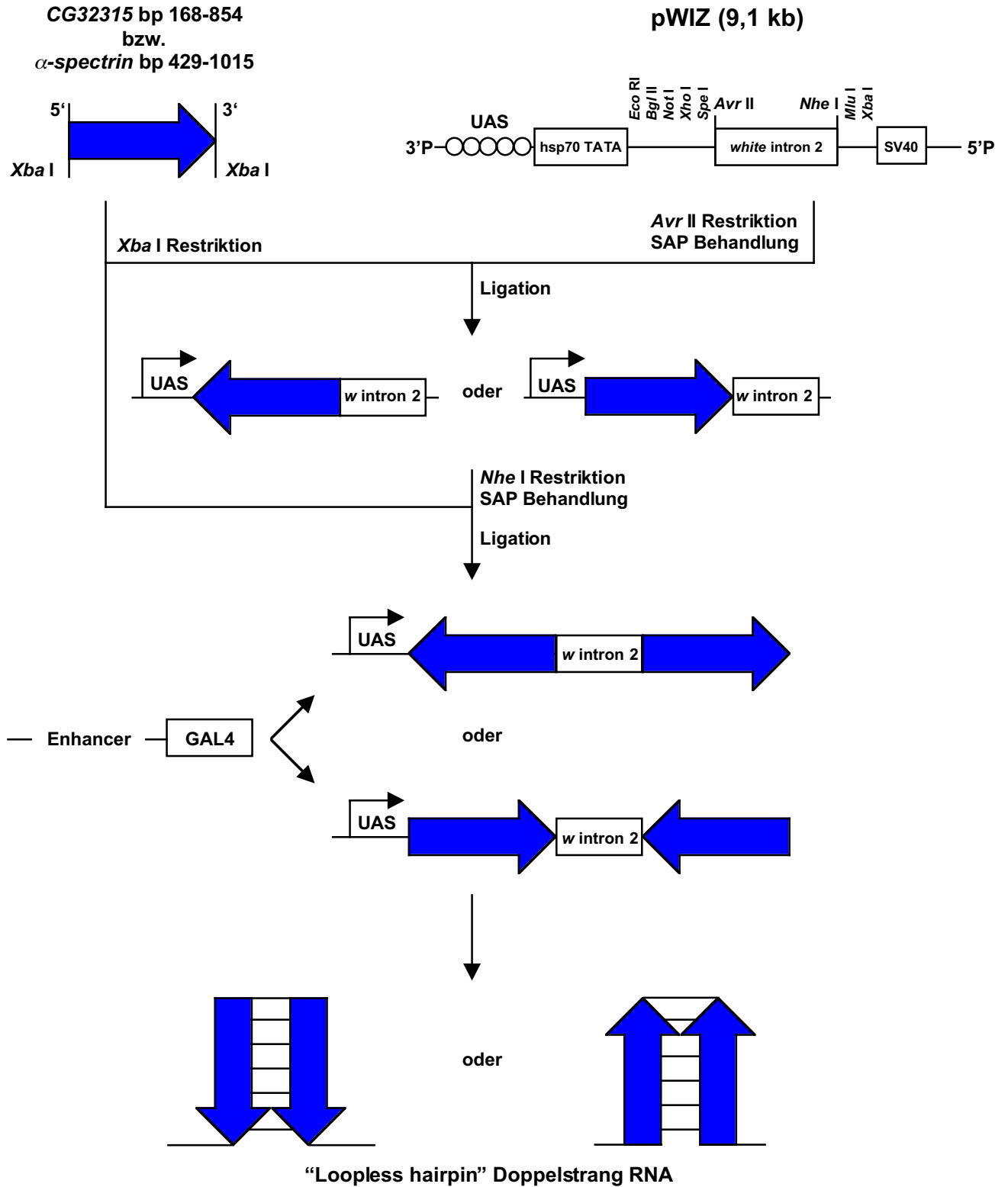


Abb. 22 Klonierung der UAS-RNAi Konstrukte. Ein spezifisches PCR-Produkt für *a-spectrin* bzw. *CG32315* wurde in den Vektor pWIZ beiderseits des *white*-Introns 2 in gegensätzlicher Orientierung kloniert. Für beide Gene wurden Konstrukte beider Orientierungen hergestellt, um mögliche Spleißfehler auszuschließen. Das Konstrukt kann durch die Verwendung spezifischer GAL4-Treiberlinien zellspezifisch exprimiert werden. In den Zellen wird die entsprechende prä-RNA gespleißt und es kommt zur Bildung von Doppelstrang RNA-Fragmenten (Schema modifiziert nach Lee & Carthew, 2002).

Ergebnisse

Expression mit anderen Treibern wurden ähnliche Resultate erzielt (Tabelle 3). Um einen qualitativen Eindruck der induzierbaren Phänotypen zu bekommen, wurden auch Treiber verwendet, die zu Phänotypen in adulten Geweben führen. Bei einer Expression mit *en-GAL4*, *ptc-GAL4* (Flügel) und *ey-GAL4* (Auge) konnten ähnliche Phänotypen für die α -*spectrin* und *CG32315 RNAi*-Konstrukte erzeugt werden (Tabelle 3, Abbildungen 23 und 24).

Tabelle 3

Konstrukt	<i>da-GAL4</i>	<i>rho-GAL4</i>	<i>en-GAL4</i>	<i>ey-GAL4</i>	<i>sca-GAL4</i>
<i>CG32315-F</i>	L3/pupal letal	pupal letal	Flügel PT	Augen PT bei Männchen	vital
<i>CG32315-R</i> (2x)	pupal letal L1/2 letal	pupal letal L1-L3 letal	Flügel PT pupal letal	kein PT n.b.	vital
<i>α-spec-F</i>	L1/2 letal	L1 letal	Flügel PT	Augen PT	pupal letal - Escaper
<i>α-spec-R</i> (2x)	L1/2 letal	L1-L3 letal	Flügel PT pupal letal	Augen PT	pupal letal - Escaper

Test der RNAi-Konstrukte. Die Expression der *RNAi*-Konstrukte in verschiedenen Geweben führt zu ähnlichen Phänotypen bei α -*spectrin* und *CG32315*. Generell zeigten die ersten Versuche stärkere Phänotypen bzw. frühere Letalitätsphasen bei der Inaktivierung von α -*spectrin*. L: Larvalstadium, PT: Phänotyp.

Die Expression von *CG32315-R* und *α -spec-R* mit *en-GAL4* führt zu pupaler Letalität und nur vereinzelt Escaper Fliegen. Die Fliegen zeigen ähnliche Flügelphänotypen (Abb. 23). Bei der Inaktivierung beider Gene kommt es zu Störungen der Entwicklung der L5-Vene; der Venenbereich ist deutlich verbreitert und es werden ektopischen Venen gebildet. Die Phänotypen der beiden unterschiedlichen *CG32315 RNAi*-Konstrukte unterscheiden sich leicht. Bei *CG32315-R* ist das posteriore Flügel-Kompartiment (die *en-GAL4* Domäne) sehr brüchig und die Flügel entfalten sich oftmals nicht (Abb. 23 D). Allerdings kommt es nicht zur Ausbildung ektopischen Venenmaterials wie bei *CG32315-F* (Abb. 23 E, F). Bei der Expression des *CG32315-F RNAi*-Konstruktes wurde auch der Verlust von Flügelstrukturen beobachtet (Abb. 23 F)

Auch die Inaktivierung der beiden Gene im Auge führt zu ähnlichen Phänotypen. Es kommt zu einer Veränderung der Augenform und oftmals zu dem Verlust ventraler Augenbereiche (Abb. 24). Die Phänotypen der *RNAi*-Inaktivierung der beiden Gene sind wiederum nicht ganz identisch und relativ variabel (Abb. 24). Neben dem Verlust ventraler Bereiche führt die Inaktivierung von α -*spectrin* meist zu einem rauhen Augenphänotyp (Abb. 24 B, C), während die Inaktivierung von *CG32315* oft nur zu einer leichten Beeinträchtigung der Ordnung der Ommatidien führt. (Abb. 24 D-I). Um genauere Aussagen über die Effekte der Inaktivierung der beiden Gene machen zu können, werden momentan Stämme hergestellt,

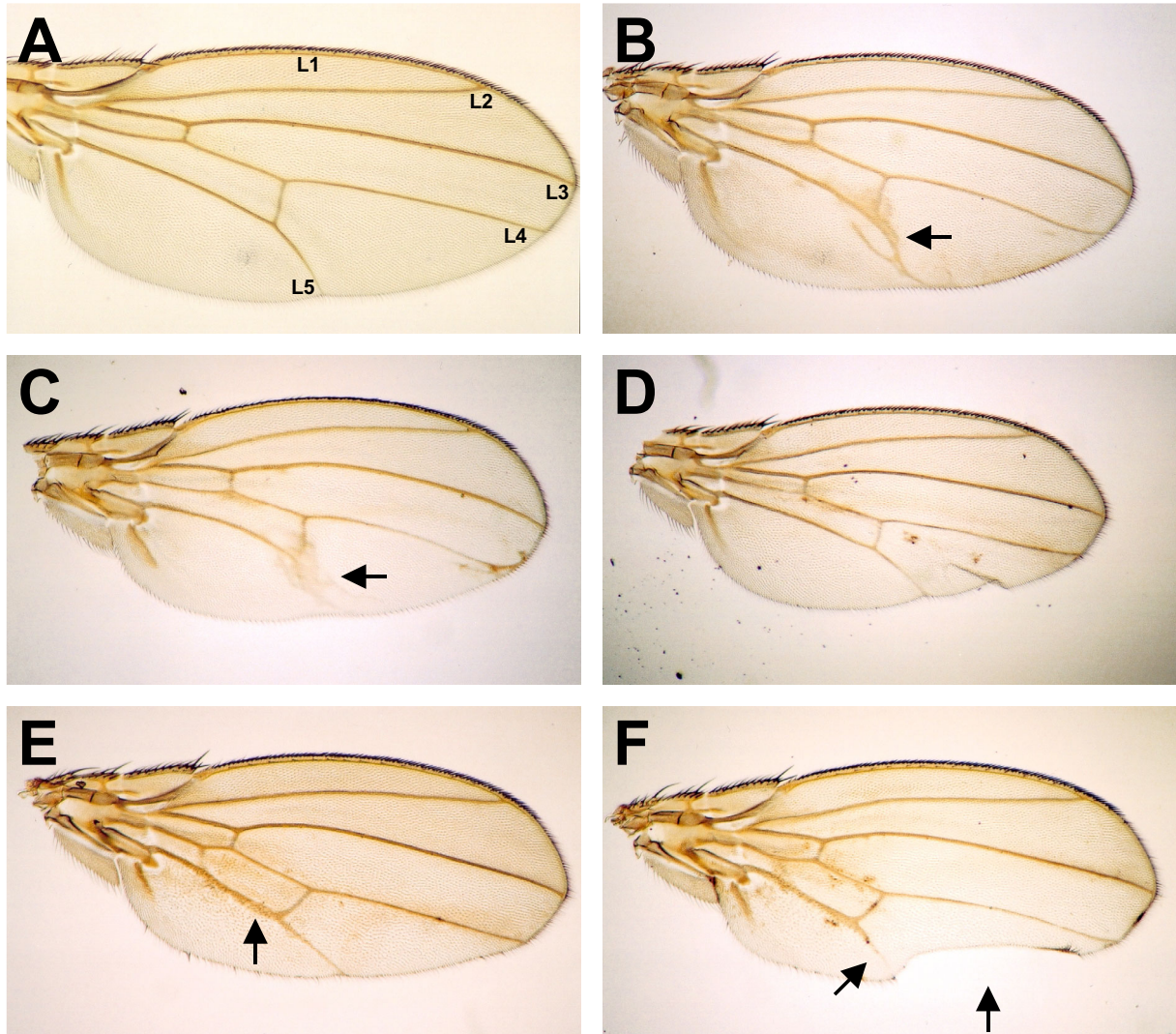


Abb. 23 Die Expression der RNAi-Konstrukte führt zu Flügelphänotypen. Dargestellt sind Flügelpräparationen, anterior ist oben. (A) Wildtyp, (B, C) *en-GAL4/UAS- α -spec-R*; (D) *en-GAL4/UAS-CG32315-R*; (E) *en-GAL4/UAS-CG32315-F* (Insertion 14); (F) *en-GAL4/UAS-CG32315-F* (Insertion 10). Die Inaktivierung von *α -spectrin* bzw. *CG32315* durch *RNA-interference* im posterioren Flügel-Kompartiment führt zu vergleichbaren Phänotypen. Es kommt zu einer Veränderung der L5 Flügelvenen. Bei der Inaktivierung beider Gene ist sowohl eine Verdickung der Flügelvene (B, E, Pfeile) als auch ein teilweiser Verlust der Flügelvene zu beobachten (C, F, Pfeile). Bei der Expression des *CG32315-F*-Konstruktes kommt es in einigen Fällen zu einem Verlust des Flügelrandes (F, Pfeil).

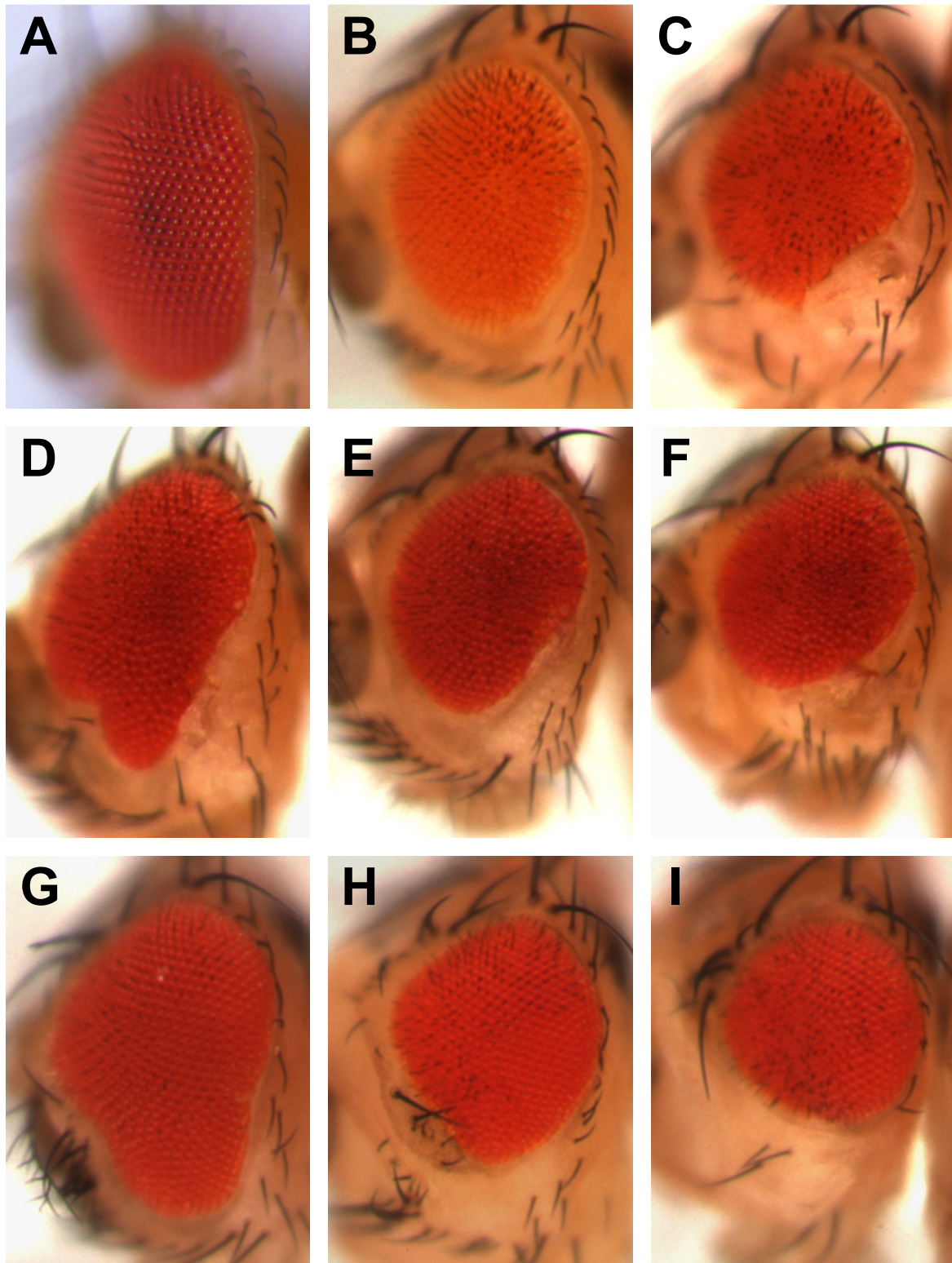


Abb. 24 Die Expression der RNAi-Konstrukte führt zu Augenphänotypen. Dargestellt sind laterale Ansichten der Komplexaugen, anterior ist links. (A) Wildtyp, (B, C) *ey-GAL4/UAS- α -spec-F*; (D-F) *ey-GAL4/UAS- α -spec-R*; (G-I) *ey-GAL4/UAS-CG32315-F* (Insertion 14). Die Inaktivierung von *α -spectrin* bzw. *CG32315* durch *RNA-interference* in der Augen-imaginalscheibe führt zu vergleichbaren Phänotypen. Es kommt besonders im ventralen Bereich zu einer Reduktion der Augengröße. Gleichzeitig ist die regelmäßige Anordnung der Ommatidien gestört (C, F, I). Die beobachteten Phänotypen sind sehr variabel und reichen von einer leichten Beeinträchtigung der Augenentwicklung (D, G) bis zu einem starken Verlust der Form und Größe des Auges (C, F, I).

Ergebnisse

die 2 Kopien des jeweiligen UAS-*RNAi* Konstruktes tragen. Die ersten wichtigen Erkenntnisse der *RNAi* Analysen sind:

Das Gen *CG32315* ist essentiell für die Entwicklung von *Drosophila*.

Die Inaktivierung beider Gene führt zu ähnlichen Phänotypen, die besonders im Auge den Phänotypen, die durch die klonale Analyse der *klötzchen* EMS-Allele erzielt wurden, ähneln.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer Funktion des Gens *CG32315* bei der Regulierung der α -spectrin mRNA Level. Weiterführende Experimente sollen zeigen, ob durch eine Expression des *CG32315 RNAi* Konstruktes die α -spectrin mRNA bzw. Proteins Level reduziert werden können. Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Gen *CG32315 klötzchen* entspricht, und dass die Funktion von *klötzchen/CG32315* die Regulation der α -spectrin mRNA Level ist.

3.3 Analyse des Gens *kästchen*

3.3.1 Molekulare Charakterisierung von *kästchen*

Erste Ergebnisse zur molekularen Analyse von *kästchen* lagen zu Beginn dieser Arbeit vor (Pielage, 1999). Der Ausgangspunkt für die molekulare Identifizierung von *kästchen* war ein P-Element induziertes *kästchen* Allel, das in den Bereich 66D5-6 kartiert. Das P-Element *kas^{l(3)j8E8}* komplementiert keines der drei *kästchen* EMS-Allele, *kas^{B1-89}*, *kas^{D3-66}* und *kas^{O1-41}*. Die Insertion führt zu pupaler Letalität und *kas^{l(3)j8E8}* mutante Embryonen zeigen einen sehr schwachen ZNS-Phänotyp. Ungefähr 500 bp distal der P-Element Insertion *kas^{l(3)j8E8}* befindet sich ein Gen, das für eine Glutathion-S-Transferase (GST-I) kodiert (BDGP). Aufgrund der Nähe zur P-Element Insertion war diese Glutathion-S-Transferase ein aussichtsreicher Kandidat, der das Gen *kästchen* kodieren könnte.

Das P-Element *kas^{l(3)j8E8}* wurde mobilisiert, um zu zeigen, dass die Insertion des P-Elements für die nicht-Komplementation der *kästchen* Letalität verantwortlich ist. Zudem sollten durch unpräzise Exzisionen des P-Elements kleine Deletionen der genomischen Region erzeugt werden. Präzise Exzisionen führten zu einer Reversion der Letalität in Transheterozygose zu *kästchen* EMS-Allelen. Gleichzeitig konnte eine große Anzahl neuer *kästchen* Allele erzeugt werden, die zu embryonaler bzw. larvaler Letalität führen. Die molekulare Analyse der „jump out“ Allele zeigte, dass eine größere Deletion der Region erzeugt werden konnte (*kas^{Δ33-4}*). Die Deletion betrifft einen genomischen Bereich von

Ergebnisse

mindestens 5 kb beiderseits der ursprünglichen P-Element Insertion (siehe Abb. 25) und somit auch das Gen *GST-I* (Pielage, 1999). Die molekulare Analyse des Gens *kästchen* wurde in dieser Arbeit fortgeführt.

3.3.1.1 *kästchen* entspricht nicht *GST-I*

Die Sequenzierung des genomischen Bereiches distal von *GST-I* zeigte, dass *GST-I* zu einem Gen-Cluster von insgesamt 4 *Glutathion-S-Transferasen* kodierenden Genen gehört. Zur Überprüfung der Hypothese, dass *GST-I* *kästchen* kodiert, wurde ein UAS-Konstrukt von *GST-I* hergestellt und entsprechende transgene Fliegen generiert. Es konnten mehr als 15 unabhängige, transgene UAS-*GST-I* Stämme etabliert werden. Die ektopische Expression dieses Transkriptes mit verschiedenen GAL4-Treiberlinien führt zu keinem dominanten Phänotyp. Jedoch konnte weder der *kästchen* ZNS-Phänotyp noch die *kästchen* Letalität durch eine Expression des *GST-I* Transkriptes im Hintergrund der *kästchen* EMS-Allele revertiert werden. Zur weiteren Analyse wurde der offene Leseraster von *GST-I* in den *kästchen* EMS-Allelen sequenziert. Es konnten keine Aminosäure-Austausche nachgewiesen werden. Diese Befunde sprechen gegen eine Kodierung von *kästchen* durch das Gen *GST-I*.

3.3.1.2 Generierung von P-Element induzierten *kästchen* Allelen

Zur molekularen Identifizierung von *kästchen* wurde eine P-Element Mutagenese durchgeführt. In einem „local hop“ Ansatz wurde versucht, neue P-Element induzierte *kästchen* Allele zu isolieren, die durch ihren Insertionsort Aufschluß über die molekulare Identität von *kästchen* geben sollten. Ausgangspunkt für die „local hop“ Mutagenese waren 2 verschiedene P-Element Insertionen. Zum einen das *EP(3)0595*, das etwa 12 kb distal des P-Elements *kas^{l(3)j8E8}* kartiert und zum anderen das *EP(3)3212*, das ca. 10 kb proximal von *kas^{l(3)j8E8}* kartiert. Es wurden jeweils mehr als 400 unabhängige Männchen selektioniert, die aufgrund der Veränderung ihrer Augenfarbe eine Mobilisierung des P-Elements, das *white⁺* markiert ist, zeigten. Diese Männchen wurden direkt auf eine Komplementation der *kästchen* EMS-Allele getestet.

Ausgehend von dem *EP(3)0595* konnten 3 unabhängige P-Element induzierte *kästchen* Allele isoliert werden (*kas⁵⁹⁵⁻¹* - *kas⁵⁹⁵⁻³*). Zusätzlich konnte ein P-Element induziertes Allel ausgehend vom *EP(3)3212* identifiziert werden (*kas³²¹²⁻¹*). Der Insertionsort der 4 neuen P-Element induzierten *kästchen* Allele wurden mittels Einzelfliegen Inverser PCR analysiert. Für die beiden *kästchen* P-Elemente *kas⁵⁹⁵⁻¹* und *kas⁵⁹⁵⁻²* konnte die flankierende Sequenz der

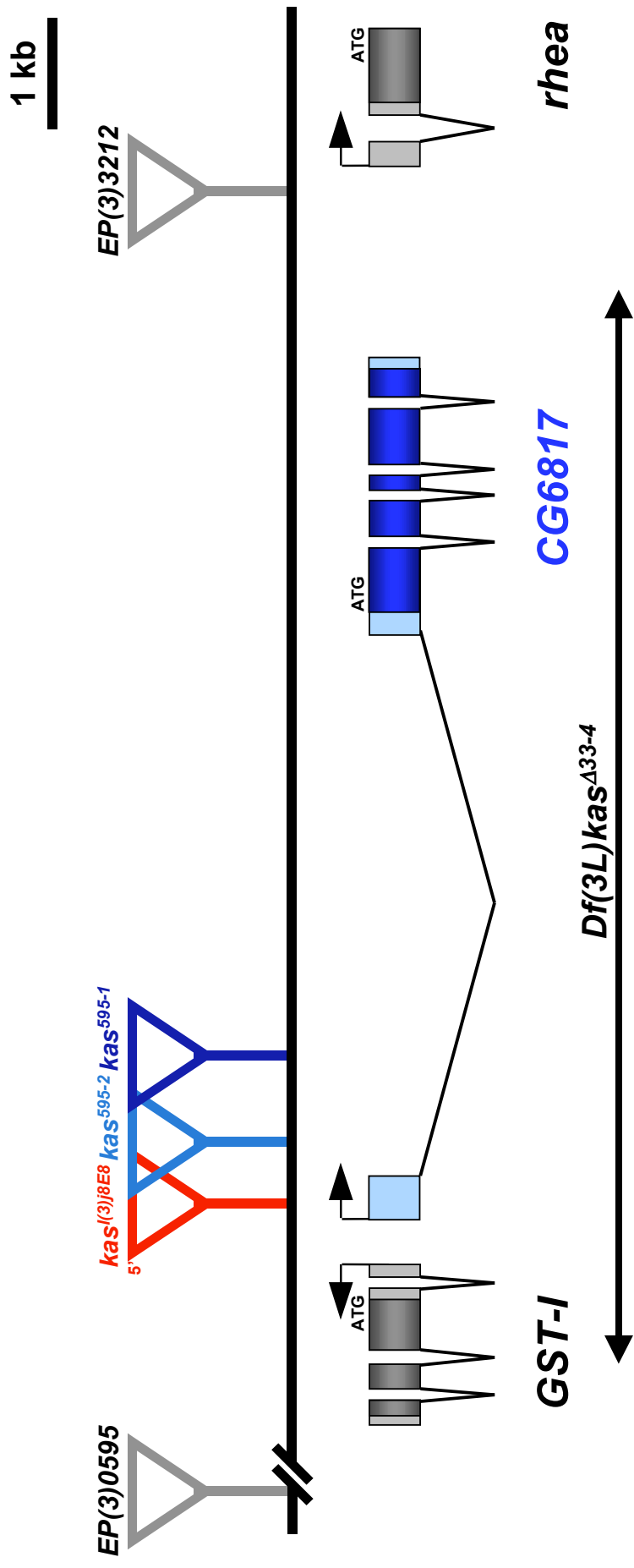


Abb. 25 Die *kästchen* Region. *kästchen* kartiert in den Bereich 66D5-6 auf dem linken Arm von Chromosom 3. Die drei P-Element induzierten *kästchen* Allele (*kas*^{(3)8E8}, *kas*⁵⁹⁵⁻¹ und *kas*⁵⁹⁵⁻²) sind eingezeichnet. *kas*⁵⁹⁵⁻¹ und *kas*⁵⁹⁵⁻² wurden ausgehend von *EP*(3)0595 induziert und kartieren innerhalb des ersten Introns von *CG6817*. Das P-Element *kas*^{(3)8E8} ist im ersten Exon von *CG6817* (blau) inseriert. Aufgrund der Orientierung in 5'-3' Richtung relativ zu dem Gen *CG6817* spiegelt das Expressionsmuster der Enhancer Trap Insertion *kas*^{(3)8E8} wahrscheinlich Teilaspekte der endogenen Expression von *CG6817* wieder. Alle *kästchen* Mutationen komplementieren Mutationen des Gens *rhea*. *kästchen* entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Gen *CG6817*.

Ergebnisse

P-Element Insertionen eindeutig bestimmt werden. Beide P-Elemente kartieren im Bereich von 0,5-2 kb proximal des P-Elements $kas^{l(3)j8E8}$. Das P-Element kas^{595-3} kartiert aller Wahrscheinlichkeit nach auch in diesen Bereich. Die Sequenzierung der Inversen PCR-Fragmente ausgehend von diesem P-Element führte jedoch nur zu schlechten Sequenzen, so dass keine zweifelsfreie Bestimmung des Insertionsortes möglich war. Für das P-Element induzierte Allel kas^{3212-1} konnte kein flankierendes genomisches DNA-Fragment isoliert werden. Bei diesem Allel könnte es sich auch um eine Deletion der Umgebung des Ausgangs P-Elements handeln. Die Veränderung der Augenfarbe des putativen „jumps“ käme durch die Insertion in einen für *kästchen* nicht-relevanten genomischen Bereich zustande.

Alle 4 P-Element induzierten *kästchen* P-Elemente führen zu embryonaler bzw. früh larvaler Letalität. Der ZNS-Phänotyp dieser Allele ist deutlich schwächer als der Phänotyp der EMS-induzierten Allele (Daten nicht gezeigt). Die genaue Position der *kästchen* P-Elemente zueinander ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Erzeugung und Identifizierung der neuen *kästchen* P-Elemente hat somit nicht wesentlich zur Klärung der molekularen Identität von *kästchen* beigetragen. Der genomische Bereich der neuen *kästchen* P-Element Insertionen wurde bereits auf das Vorhandensein weiterer Transkripte getestet (Pielage, 1999).

Die Sequenzierung des *Drosophila* Genoms und die Vorhersage putativer Gene (Adams et al., 2000; BDGP) zeigte, dass ca. 7 kb proximal der *kästchen* P-Elemente der ORF eines bisher unbekanntes Gens vorhergesagt wird (*CG6817*). Die Sequenzierung neuer cDNA Bänke durch das BDGP (2001) führte zur Identifizierung von cDNA-Klonen des Gens *CG6817*. Die Sequenzanalyse dieser cDNA-Klone zeigte, dass das *kästchen* P-Element $kas^{l(3)j8E8}$ innerhalb des ersten, nicht translatierten Exons des Gens *CG6817* inseriert ist, und dass die *kästchen* P-Elemente kas^{595-1} und kas^{595-2} innerhalb des ersten Introns dieses Transkriptes kartieren (Abb. 25). Diese Daten, zusammen mit den Analysen der $kas^{l(3)j8E8}$ „jump out“-Allele zeigen, dass *kästchen* sehr wahrscheinlich von dem Gen *CG6817* kodiert wird. Die internen Deletionen des P-Elements $kas^{l(3)j8E8}$ könnten die Transkription des Gens unterschiedlich stark beeinflussen, so dass es zu unterschiedlichen Letalitätsphasen der verschiedenen „jump out“-Allele kommt (s.o., Pielage, 1999).

Das Gen *CG6817* kodiert für ein 671 Aminosäuren großes Protein. Homologe des Proteins finden sich u.a. bei *Anopheles Gambiae*, der Maus und dem Mensch. Die Analyse der Sekundärstruktur deutet darauf hin, dass es sich bei *CG6817* um ein Transmembranprotein handelt. Die Analyse der Homologen und der Sekundärstruktur wird

im Abschnitt 3.3.8 behandelt. Um Aufschlüsse über eine mögliche Funktion von *kästchen* zu erhalten, wurde zunächst eine ausführliche phänotypische Analyse durchgeführt.

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung von *kästchen*

3.3.2.1 Analyse des fusionierten Kommissurenphänotyps

In Abbildung 26 ist der ZNS-Phänotyp homozygot mutanter *kästchen* Embryonen dargestellt. Die beiden Allele kas^{B1-89} und kas^{D3-66} führen zu einer starken Fusion der Kommissuren. Beide Mutationen wurden auf einem Chromosomen induziert, das die Enhancer-Trap Insertion $P[w^+, lacW]AA142$ trägt, die zur Markierung der ML-Gliazellen genutzt werden kann (Hummel et al., 1999a). Die Anzahl der ML-Gliazellen ist in beiden Fällen reduziert, man findet oft nur noch 1-2 anstelle der wildtypischen 3-4 ML-Gliazellen. Das Allel kas^{O1-41} führt nur zu einer schwachen Fusion der Kommissuren, in vielen Segmenten sind noch axonfreie Bereiche zwischen der anterioren und posterioren Kommissur zu finden. Zur Beurteilung der Stärke der Mutationen wurden die ZNS-Phänotypen in Transheterozygose zu der kleinen Defizienz $kas^{\Delta 33-4}$ analysiert. Der Phänotyp der beiden starken Allele kas^{B1-89} und kas^{D3-66} verstärkt sich nicht bzw. kaum über der Defizienz (Abb. 26 E). Hingegen findet man eine deutliche Verstärkung des ZNS-Phänotyps des Alleles kas^{O1-41} in Transheterozygose zu $kas^{\Delta 33-4}$. Bei den beiden Allelen kas^{B1-89} und kas^{D3-66} handelt es sich somit um stark hypomorphe bzw. amorphe Allele, während kas^{O1-41} eine hypomorphe *kästchen* Mutation ist. Der Phänotyp der kleinen Defizienz $kas^{\Delta 33-4}$ entspricht in etwa dem Phänotyp von kas^{B1-89} und kas^{D3-66} (Pielage, 1999).

Entscheidend für die Trennung der anterioren und posterioren Kommissur ist die Interaktion zwischen den ML-Gliazellen und den ML-Neuronen, die als Substrat für die Migration der ML-Gliazellen dienen. Mit Hilfe des Antikörpers 22C10 wurde die Projektion der ML-Neurone (VUM-Neurone) in *kästchen* mutanten Embryonen analysiert. Um genetische Hintergrundeffekte der EMS-Allele ausschließen zu können, wurden die ZNS-Phänotypen von Embryonen der *kästchen* EMS-Allele in Transheterozygose zu der Defizienz $kas^{\Delta 33-4}$ untersucht. Sowohl bei schwachen als auch bei starken *kästchen* Allelen kommt es zu keiner auffälligen Beeinträchtigung der Projektion der ML-Neurone von der posterioren zur anterioren Kommissur. Während die generelle Gestalt des ZNS deutlich gestört ist und leichte Faszikulierungsdefekte insbesondere im Bereich der Konnektive zu beobachten sind, so sind nur vereinzelt Fehlprojektionen der VUM-Neurone festzustellen (Abb. 27 C, D). Die Ursache

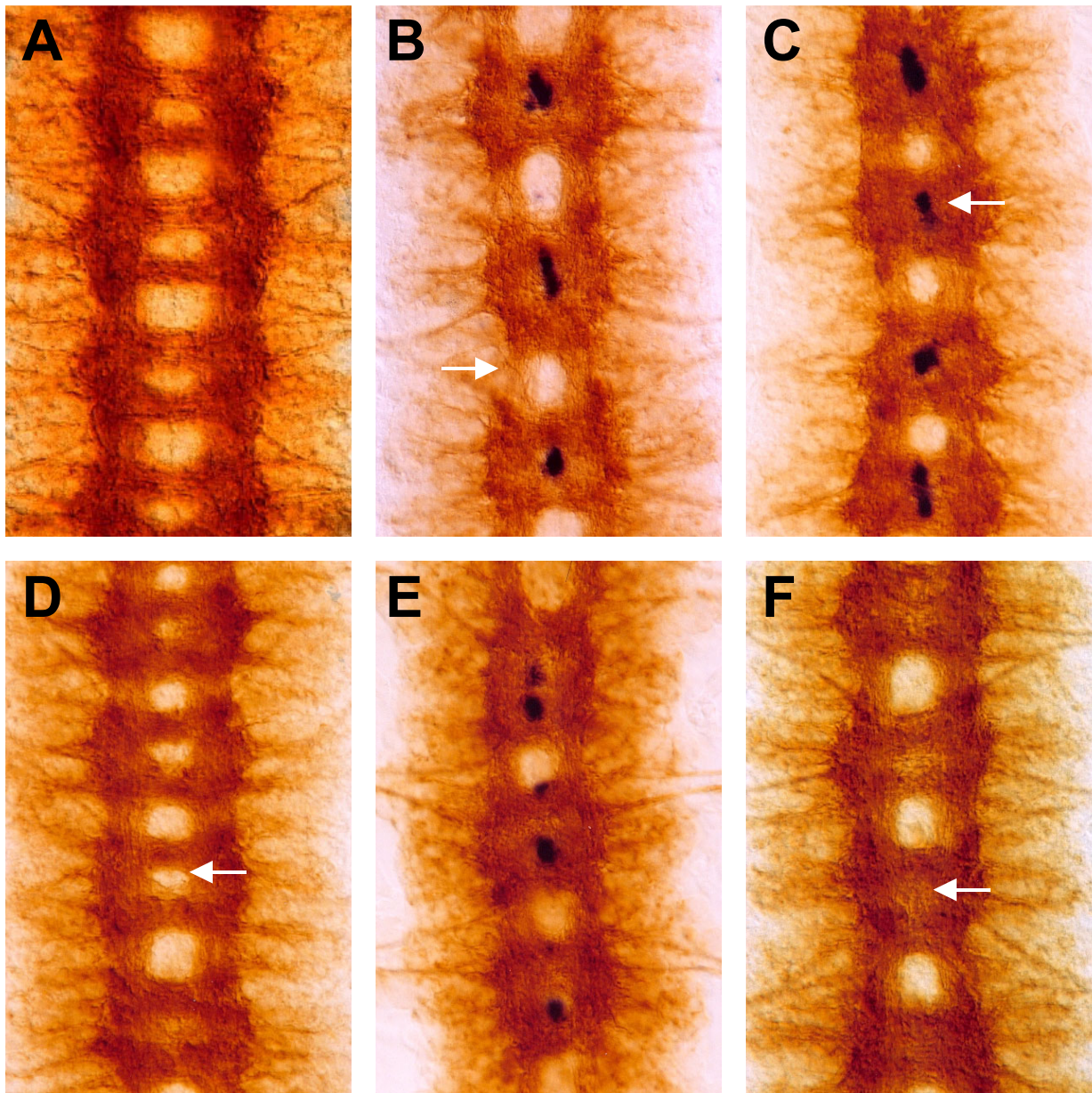


Abb. 26 Der *kästchen* ZNS-Phänotyp. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. Die ML-Gliazellen wurden mit der Enhancer Trap Insertion *AA142* markiert. (A) Wildtyp; (B) *kas^{B1-89}*; (C) *kas^{D3-66}*; (D) *kas^{O1-41}*; (E) *kas^{B1-89}/kas^{Δ33-4}*; (G) *kas^{O1-41}/kas^{Δ33-4}*. Die *kästchen* Mutationen führen zu einer Fusion der Kommissuren und zu einer leichten Reduktion der Konnektive. Die Reduktion der Konnektive und die vollständige Fusion der Kommissuren ist besonders gut bei homozygot mutanten *kas^{B1-89}* und *kas^{D3-66}* Embryonen zu erkennen. Die Anzahl der ML-Gliazellen ist reduziert (B, C, Pfeile). *kas^{B1-89}* und *kas^{D3-66}* sind stark hypomorphe oder amorphe *kästchen* Mutationen, da es zu keiner wesentlichen Verstärkung des ZNS-Phänotyps in Transheterozygose zu der Deletion *kas^{Δ33-4}* kommt (E). Bei dem schwachen *kästchen* EMS-Allel *kas^{O1-41}* sind immer noch axonfreie Bereiche zwischen der anterioren und posterioren Kommissur zu detektieren (D, Pfeil). Der Phänotyp dieser Mutation verstärkt sich über der Deletion *kas^{Δ33-4}*. Es kommt zu einer vollständigen Fusion der Kommissuren (F, Pfeil)

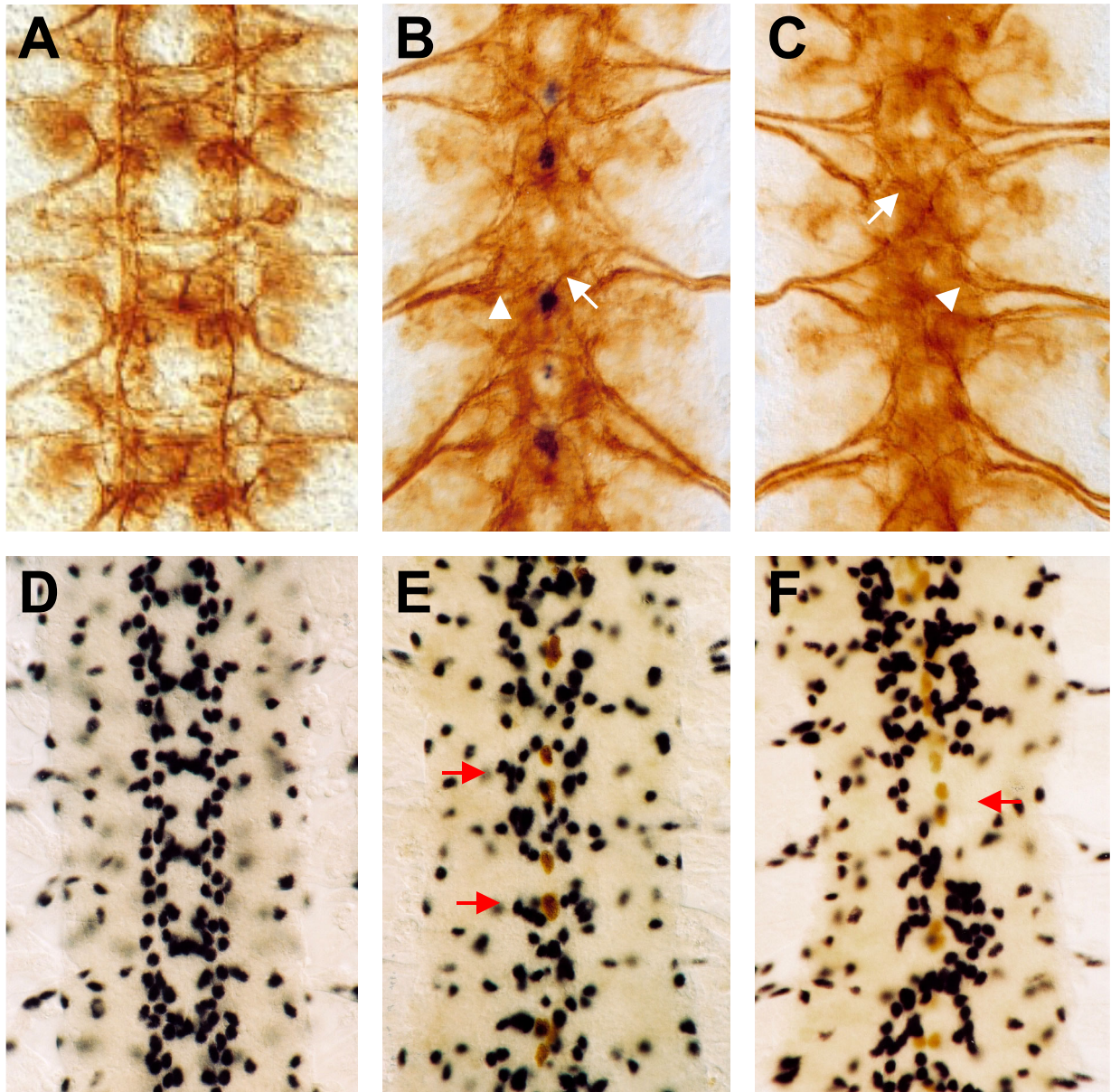


Abb. 27 Analyse der VUM-Neurone und der lateralen Gliazellen. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Die Verteilung der lateralen Gliazellen wurde mit dem mAb anti-Repo (D-F) und die Projektionen der VUM-Neurone mit dem mAb 22C10 (A-C) analysiert. (A, D), Wildtyp; (B) *kas^{B1-89}/kas^{Δ33-4}*; (C) *kas^{O1-41}/kas^{Δ33-4}*; (E) *kas^{B1-89}*; (F) *kas^{D3-66}*. In *kästchen* mutanten Embryonen kommt es nur zu leichten Defekten bei der Projektion der VUM-Neurone (B, C, Pfeile) aber zu einer deutlichen Störung der Faszikulation der Neurone (B, C, Pfeilspitzen). Die Migration der lateralen Gliazellen entlang der Konnektive ist beeinträchtigt. Die Gliazellen befinden sich vermehrt im Bereich der Kommissuren und sind nicht mehr regelmäßig angeordnet (Vergleiche D, E, Pfeile). In einigen Embryonen kommt es zu einer völligen Abwesenheit von Gliazellen in einzelnen Segmenten (F, Pfeil). Dieser Phänotyp ist zum Teil auf den Darmdefekt *kästchen* mutanter Embryonen zurück zuführen.

Ergebnisse

für den fusionierten Kommissurenphänotyp in *kästchen* mutanten Embryonen ist folglich eher eine fehlerhafte Differenzierung der ML-Gliazellen oder eine Störung der Kommunikation zwischen den Neuronen und Gliazellen.

Da *kästchen* mutante Embryonen auch starke Defekte im Bereich der Konnektive aufweisen, wurden die longitudinalen Gliazellen genauer analysiert. Der anti-Repo Antikörper markiert die Zellkerne aller Gliazellen mit Ausnahme der ML-Gliazellen. Im Wildtyp (Abb. 27 D) erkennt man die sehr regelmäßige Anordnung der Gliazellen entlang der Axone der Konnektive und Kommissuren. In *kästchen* mutanten Embryonen kommt es zu einer Störung der Migration bzw. finalen Positionsfindung der lateralen Gliazellen. Die Gliazellen sind nicht mehr regelmäßig entlang der Konnektive angeordnet, sondern häufen sich im Bereich der Kommissuren (Abb. 27 E). Während in Abbildung 27 E ein sehr typischer Phänotyp zu sehen ist (mehr als 70% der Embryonen), so verdeutlicht Abb. 27 F eine zusätzliche phänotypische Komponente. In *kästchen* mutanten Embryonen kommt es zur Ausbildung eines starken Darmdefekts. Die Konstriktionen des Mitteldarms sind unvollständig, so dass der Darm im Bereich des Mitteldarms starke Ausbuchtungen zeigt und die Entwicklung des ZNS stören kann. Als Folge kommt es zu einer sekundären Verstärkung des glialen Phänotyp, der vollständigen Abwesenheit von lateralen Gliazellen in den mittleren Abdominalsegmenten; in etwa 10% der *kästchen* mutanten Embryonen kommt es zur Ausbildung eines solchen Phänotyps.

3.3.2.1 *kästchen* betrifft die Entwicklung des peripheren Nervensystems

Die Funktion von *kästchen* ist nicht auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems beschränkt. Für die Analyse der *kästchen* Funktion für das periphere Nervensystem (PNS) wurden verschiedene neuronale und gliale Marker eingesetzt. Der Antikörper 22C10 erkennt alle peripheren Neurone und ihre Projektionen ins ZNS. Es lassen sich 4 neuronale Cluster unterscheiden, die sich segmental wiederholen (Abb. 28 A). Die Enhancer-Trap Linie *J29* ist eine vitale P[*w*⁺, *lacW*] Insertion im 5' Bereich des *gliotactin* Gens und eignet sich zur Markierung einer Subpopulation der peripheren Gliazellen (Auld et al., 1995). *J29* markiert die Zellkerne von 3 Gliazellen, die im ZNS geboren werden und in die Peripherie migrieren, und eine weitere Gliazelle, die im PNS geboren wird (Abb. 28 A). Der Antikörper anti-Repo markiert auch im PNS alle glialen Zellkerne. Beim Vergleich der Wildtyp Darstellungen des peripheren Nervensystems und der peripheren Gliazellen (Abb. 28 A, G) wird deutlich, dass die Gliazellen ähnlich wie im ZNS sehr eng mit den Neuronen und ihren axonalen Fortsätzen

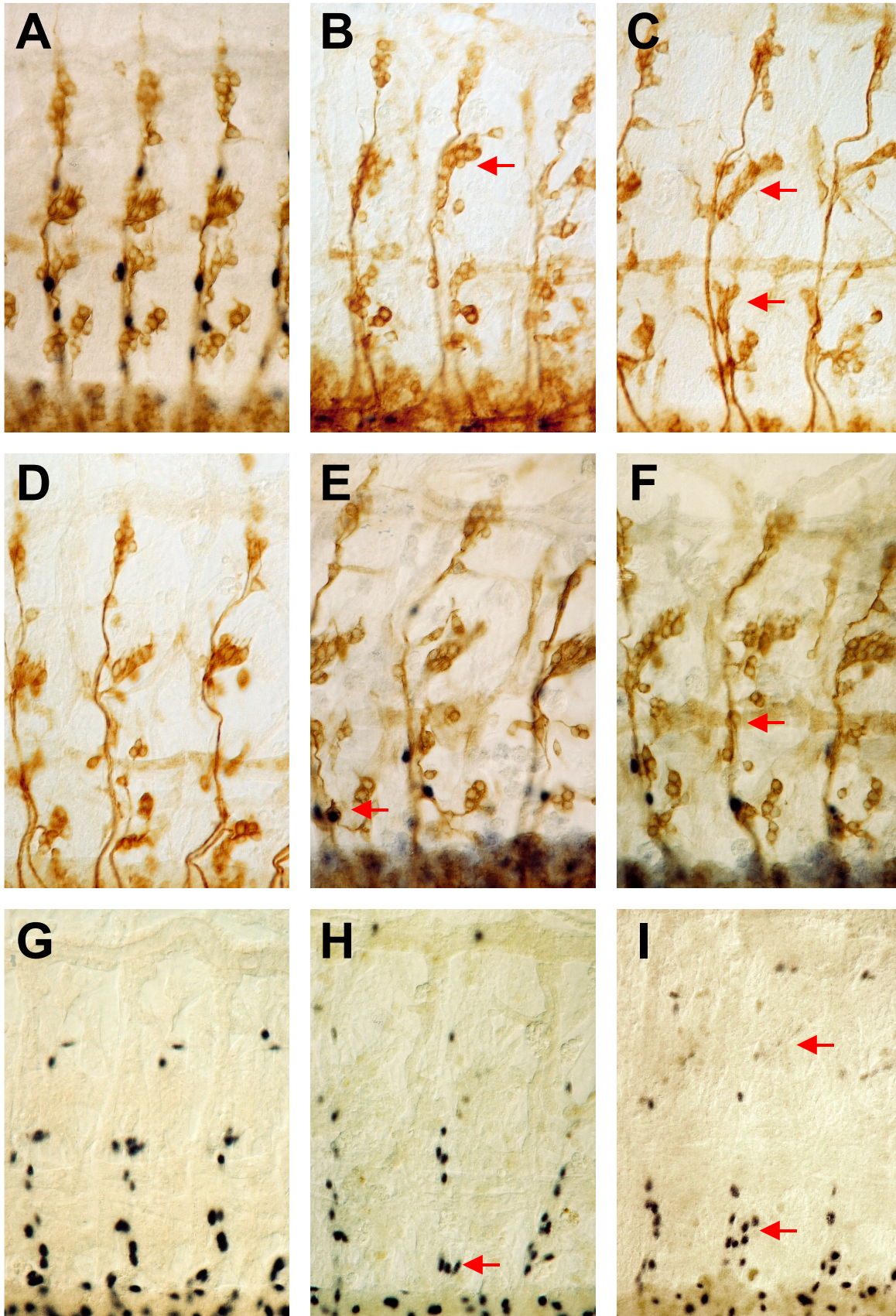


Abb. 28 *kästchen* Phänotypen im peripheren Nervensystem. PNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist links. Die Anordnung der peripheren Neurone wurde mit dem mAb 22C10 (A-C) und die Migration der peripheren Gliazellen mit Hilfe der Enhancer Trap Insertion *J29* (A, D, E) und mit dem mAb anti-Repo (G-I) analysiert. (A, G), Wildtyp; (B) *kas^{B1-89}/kas^{Δ33-4}*; (C) *kas^{D3-66}/kas^{Δ33-4}*; (D) *kas^{O1-41}/kas^{Δ33-4}*; (E, H) *kas^{B1-89}*; (F, I) *kas^{D3-66}*. In *kästchen* mutanten Embryonen kommt es zu einem leichten Verlust der Anzahl und der Kompaktierung der PNS-Neuronen (B-F, Pfeile). Die Migration der peripheren Gliazellen ist gestört (E, F, H, I, Pfeile).

Ergebnisse

assoziiert sind. Bei allen drei *kästchen* Allelen in Transheterozygose zu der Defizienz *kas*^{Δ33-4} kommt es zu einem Verlust der Ordnung innerhalb des peripheren Nervensystems. Besonders deutlich wird der Phänotyp bei Betrachtung der ventrolateralen Neurone und der lateralen Chordotonalorgane. Im Wildtyp ist eine enge Assoziation der Zellen zu beobachten (Abb. 28 A). In *kästchen* mutanten Embryonen sind die Neurone über einen größeren Bereich verteilt und erscheinen weniger kompakt. Zugleich kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung des Abstandes zwischen den beiden neuronalen Clustern (Abb. 28 B-F, Pfeile).

Die Markierung der *J29*-positiven Zellen zeigte, dass in *kästchen* mutanten Embryonen die Migration der Gliazellen vom zentralen Nervensystem in das periphere Nervensystem gestört ist (Abb. 28 E, F). Dieser Phänotyp wird noch deutlicher bei Betrachtung der Repo-positiven Gliazellen (Abb. 28 H, I). Einige Zellen migrieren nicht mehr ins PNS sondern verbleiben an der Grenze des ZNS. Die Positionierung der peripheren Gliazellen entspricht dem Phänotyp der Neurone. Die Zellen stehen nicht mehr in engem Kontakt zueinander, sondern verteilen sich über einen größeren Bereich innerhalb des Segments. Aufgrund der Spezifität der Antikörper (22C10 und anti-Repo sind beides monoklonale Maus Antikörper) war eine gleichzeitige Darstellung der peripheren Neurone und Gliazellen nicht möglich. Da sowohl die Neurone als auch die Gliazellen auf einen direkten Kontakt miteinander angewiesen sind (Booth et al., 2000), ist es wahrscheinlich, dass die Zellen miteinander assoziiert bleiben. Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Entfernung zwischen den einzelnen Zellen entlang der dorso-ventralen Achse zu groß ist und die Zellgruppen nicht so kompakt wie im Wildtyp vorliegen. In *kästchen* mutanten Embryonen kommt es zu Migrationsdefekten aller embryonaler Gliazellen.

3.3.2.2 *kästchen* kontrolliert Muskel- und Motoneuronentwicklung

Ebenso wie bei der Entwicklung des embryonalen Nervensystems kommt es bei der Entwicklung der somatischen Muskulatur zu einer Migration von Zellen und einer Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen. Die Zellen des Mesoderm invaginieren während der Gastrulation ins Innere des Embryos und wandern entlang des ektodermalen Epithels nach dorsal. Die Muskeln bilden sich durch eine Fusion von Muskel-Gründerzellen mit fusionskompetenten Zellen, die aus unterschiedlichen Bereichen des Embryos stammen (Ruiz-Gomez et al., 2000; Bour et al., 2000).

Neben diesen Migrationsprozessen und dynamischen Interaktionen innerhalb der somatischen Muskulatur kommt es auch zu einer direkten Interaktion mit Motoneuronen,

Ergebnisse

die aus dem ZNS in die Peripherie projizieren und spezifisch die somatische Muskulatur innervieren. Am Ende der Embryogenese kommt es zur Ausbildung eines sehr regelmäßigen Musters (Abb. 29 A). Die Vergrößerung (Abb. 29 A, Ausschnitt) zeigt deutlich die komplexe und stereotype Innervation der Muskeln durch die Motoneurone. Die einzelnen somatischen Muskeln sind eindeutig anhand ihrer Position, Lage und Innervation durch Motoneurone identifizierbar.

In *kästchen* mutanten Embryonen kommt es zu einer starken Reduzierung der Anzahl der somatischen Muskeln. Besonders betroffen sind die lateral transversalen Muskeln und einige der ventralen longitudinalen Muskeln (Abb. 29 B, C Pfeile). Alle drei *kästchen* Mutationen betreffen im wesentlichen die gleichen Muskelgruppen. Neben dem Verlust einzelner Muskeltypen kommt es auch zu einer Fehlpositionierung von Muskelansatzstellen und einer starken Formveränderung der Muskeln (Abb. 29 B-D, Ausschnitt). Der Muskelphänotyp ist wiederum bei *kas*⁰¹⁻⁴¹ schwächer ausgeprägt als bei den beiden starken *kästchen* Allelen. Ob *kästchen* für die Spezifizierung und Differenzierung bestimmter Muskelvorläuferzellen benötigt wird oder ob *kästchen* für die Fusion einzelner Muskelzellen benötigt wird, kann anhand der vorliegenden Daten noch nicht beurteilt werden. Zur Differenzierung zwischen diesen Möglichkeiten muß der Phänotyp mit verschiedenen Mesoderm-spezifischen Markern genauer charakterisiert werden.

Die Projektion der Motoneurone ist in *kästchen* mutanten Embryonen ebenfalls stark gestört. Dieser Phänotyp ist zum Teil auf den beobachteten Muskelphänotyp zurückzuführen, da das Fehlen von Zielzellen oder intermediären Zielzellen zu einer Fehlprojektion der Motoneurone führen kann. In *kästchen* mutanten Embryonen fehlen die axonalen Projektionen einer ganzen Gruppe von Motoneuronen und andere Motoneurone projizieren über Segmentgrenzen hinweg (Pfeilspitzen in Abb. 29 A-D). Im Wildtyp sind die Projektionen der Motoneurone des Segmentalnerves deutlich zu erkennen; in *kästchen* mutanten Embryonen findet man keine oder nur sehr schwache axonale Projektionen dieser Motoneurone.

kästchen ist wahrscheinlich sowohl an der Determinierung und Differenzierung von Muskelzellen und Motoneuronen, als auch an der direkten Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen beteiligt.

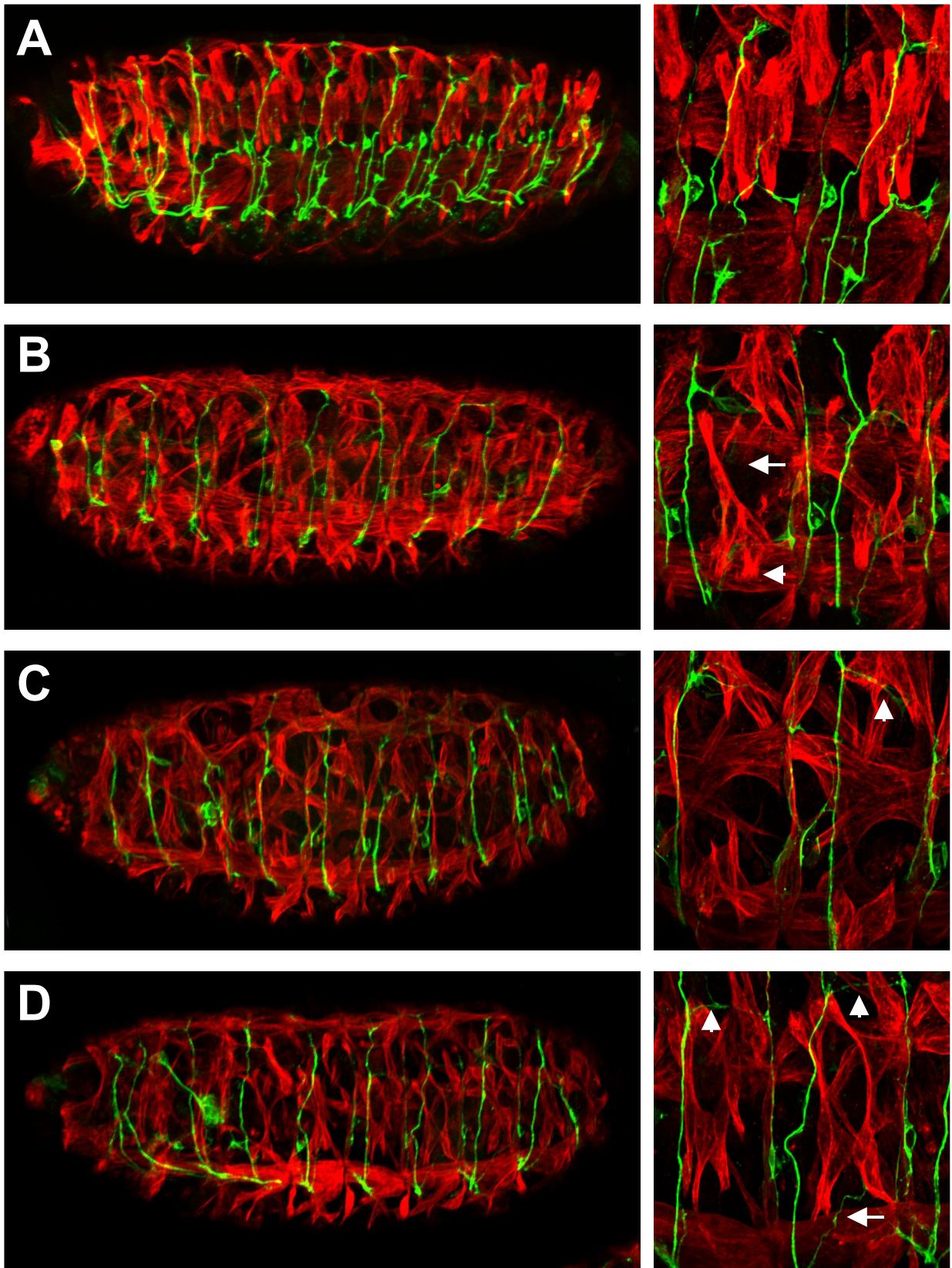


Abb. 29 Muskel- und Motoneuron-Defekte in *kästchen* mutanten Embryonen. Laterale Ansicht von *whole-mount* Embryonen des Stadiums 16. Die somatische Muskulatur wurde mit dem mAb anti- β -Tubulin (rot) und die Projektion der Motoneurone mit dem mAb 1D4 analysiert (grün). (A) Wildtyp; (B) *kas^{B1-89}*; (C) *kas^{D3-66}*; (D) *kas^{O1-41}*. Die Entwicklung der somatischen Muskulatur in *kästchen* mutanten Embryonen ist stark gestört. Es kommt zu dem Verlust einzelner Muskelgruppen. Die verbleibenden Muskeln zeigen eine abnorme Morphologie und eine Fehlpositionierung der Muskelansatzstellen (B, Pfeilspitze). Ein Großteil der axonalen Projektionen der Motoneurone fehlt (B, D, Pfeile). Gleichzeitig kommt es zu Fehlprojektionen von Motoneuronen (C, D, Pfeilspitzen).

3.3.2.2 *kästchen* hat eine Funktion bei der Keimzellmigration

Ein weiterer Prozess, bei dem es zu der Migration einzelner Zellpopulationen innerhalb des Embryos kommt, ist die Keimzellmigration. Die Keimzellen werden als erste Zellgruppe während der Entwicklung am posterioren Ende des Embryos spezifiziert. Während der Keimstreifausdehnung gelangen die Keimzellen zusammen mit den Zellen des posterioren Mitteldarm-Primordiums ins Innere des Embryos. Anschließend wandern sie durch das Darmepithel zum Mesoderm. Innerhalb des Mesoderms assoziieren die Keimzellen an die Zellen des Gonadenmesoderms und gelangen durch den Keimstreifrückzug des Embryos in die Abdominalsegmente A8-A10. Hier werden sie von den Zellen des Gonadenmesoderms umschlossen und bilden die kompakte Gonade (Abb. 30 A, B). Die Gonaden-Koaleszenz ist im Wildtyp in Stadium 14 abgeschlossen und die runde Gonade ist sowohl in lateraler als auch dorsaler Ansicht gut erkennbar (Abb. 30 A, B). Die Keimzellwanderung und Gonaden-Koaleszenz wurde mit einem anti-Vasa Antikörper analysiert, der die Zellkerne der Keimzellen markiert (Lasko and Ashburner, 1990).

In *kästchen* mutanten Embryonen sind die ersten Schritte der Keimzellwanderung nicht gestört. Nur der letzte Schritt der Kompaktierung der Keimzellen durch die Interaktion mit den Zellen des Gonaden-Mesoderms findet nicht mehr wildtypisch statt. Selbst am Ende der Embryogenese, in Stadium 16, findet man in *kästchen* mutanten Embryonen noch keine runde, kompakte Gonade (Abb. 30 C-H). Die Ausprägung des Phänotyps ist relativ variabel. In Abbildung 30 sind, zur Demonstration des phänotypischen Spektrums, phänotypisch unterschiedliche Embryonen der einzelnen *kästchen* Allele gezeigt. Es kommt bei allen drei *kästchen* EMS-Allelen zu einem qualitativ gleichwertigen Phänotyp. Die schwächste Ausprägung des Phänotyps ist in Abbildung 30 C und D dargestellt. Alle Keimzellen stehen in direktem Kontakt miteinander, werden aber nicht in eine runde Form gebracht; die Gonade besitzt eine längliche Form entlang der anterior-posterioren Achse. In anderen, mutanten Embryonen ist der direkte Kontakt zwischen den Keimzellen unterbrochen. Einzelne Keimzellen finden sich in den Abdominalsegmenten A7 – A10. Bezüglich dieses Keimzellphänotyps unterscheidet sich das schwache *kästchen* Allel *kas*⁰¹⁻⁴¹ nicht von den beiden starken *kästchen* Allelen.

Der Prozess der Keimzellwanderung wurde genetisch ausführlich untersucht. Nach einer EMS-Mutagenese ist die Mutation *fear-of-intimacy* (*foi*) isoliert worden, die ebenfalls nur diesen letzten Schritt der Gonaden-Koaleszenz betrifft (Moore et al., 1998). Die Gruppe von M. van Doren behauptet, das *foi* dem Transkript *CG6817* entspricht (Mathews and van

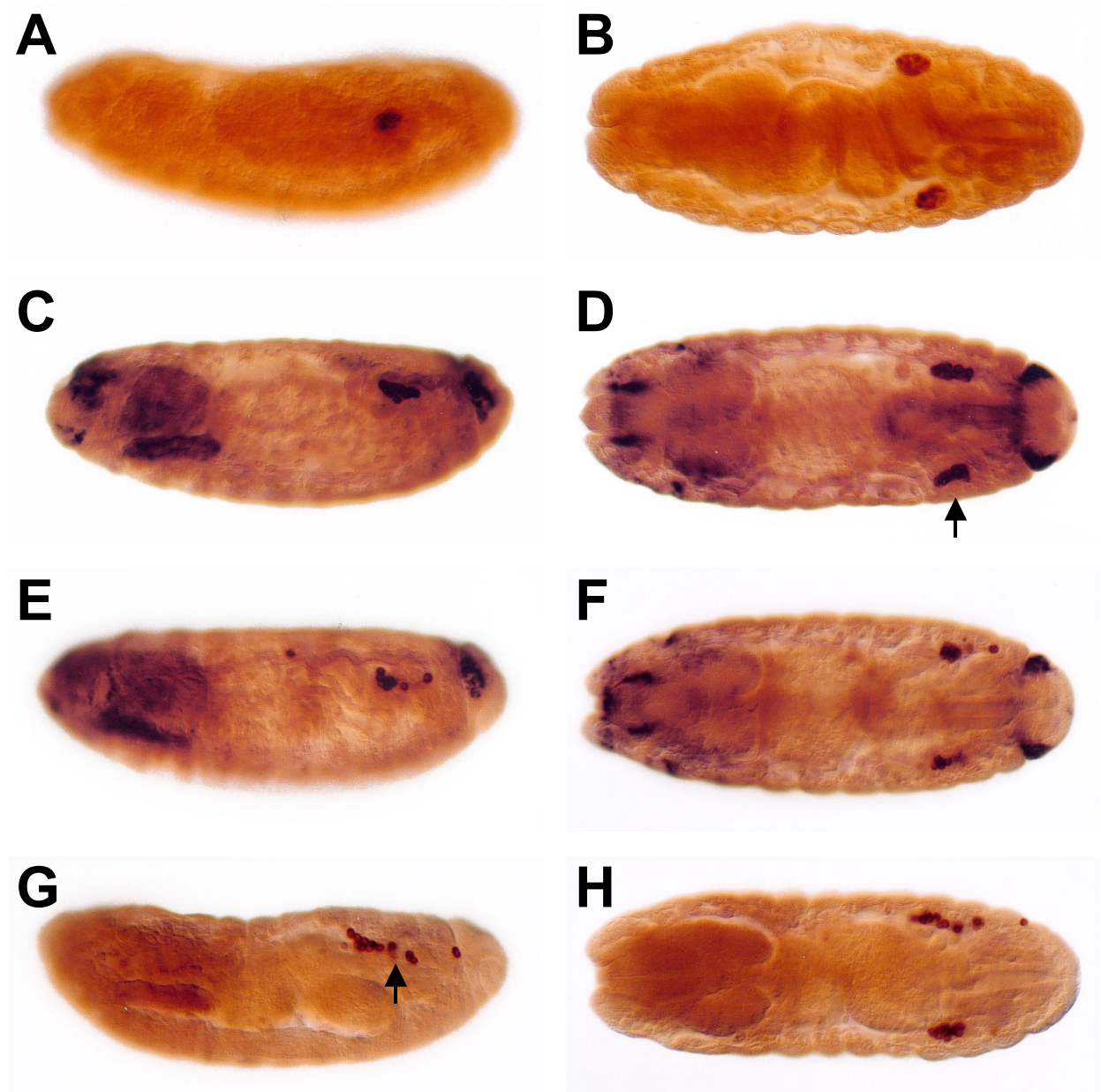


Abb. 30 *kästchen* betrifft die Keimzellmigration. Laterale (A, C, E, G) und ventrale (B, D, F, H) Ansicht von *whole-mount* Embryonen. Die Keimzellen sind durch den mAb anti-Vasa markiert. (A, B) Wildtyp; (C, D) *kas^{B1-89}*; (E, F) *kas^{D3-66}*; (C, D) *kas^{O1-41}*. In *kästchen* mutanten Embryonen ist der letzte Schritt der Keimzellmigration, die Gonaden-Koaleszenz, gestört. Die Gonaden-Koaleszenz ist im Wildtyp schon in Stadium 14 abgeschlossen, die runde Gonade ist sowohl in lateraler (A) als auch in dorsaler Ansicht (B) gut zu erkennen. In *kästchen* mutanten Embryonen ist die Gonade selbst in Stadium 16 noch länglich entlang der anterior-posterioren Achse gestreckt (B, C, Pfeil). Häufig befinden sich einzelne Keimzellen nicht im Verbund mit den restlichen Zellen (G, Pfeil). Der Keimzellphänotyp des schwachen *kästchen* Allels *kas^{O1-41}* unterscheidet sich nicht von den Phänotypen der beiden starken Allele (Vergleiche C-H).

Ergebnisse

Doren, Abstract *Drosophila* Conference 2001 und 2002). Diese Daten sind allerdings noch unveröffentlicht. Der *kästchen* Phänotyp entspricht im wesentlichen dem publizierten Keimzellphänotyp von *foi* (Moore et al., 1998). Zusammen mit den Aussagen der Gruppe von M. van Doren ist es wahrscheinlich, dass *kästchen fear-of-intimacy* entspricht. Eine Komplementationsanalyse mit *foi* Allelen zur Bestätigung konnte bislang noch nicht durchgeführt werden.

3.3.3 Analyse des Expressionsmusters von *CG6817*

3.3.3.1 Analyse der mRNA-Expression

Die Analyse des Expressionsmuster eines Gens ermöglicht Rückschlüsse über eine Funktion des Gens bei verschiedenen Entwicklungsprozessen. Im Idealfall läßt sich das Expressionsmuster eines Gens mit den Phänotypen der Mutationen des Gens korrelieren. Für *kästchen* wäre eine Expression des Transkriptes besonders im Nervensystem und im Mesoderm zu erwarten. Das Expressionsmuster von *kästchen/CG6817* wurde durch die Hybridisierung einer DIG-markierten RNA-Sonde an *whole-mount* Embryonen analysiert.

In Abbildung 31 ist die Expression von *CG6817* während der Embryogenese dargestellt. Bis zum Stadium 5 ist eine starke maternale Komponente des Transkriptes nachweisbar. In diesem Stadium zeigen auch die Keimzellen eine starke Expression der *CG6817* mRNA (Abb. 31 A). Die zygotische Expression von *CG6817* beginnt kurze Zeit später in einem Muster, das an die Expression eines Segmentierungsgens erinnert. Man erkennt eine Expression in 7 Domänen entlang der Längsachse des Embryos (Abb. 31 B). In Stadium 6/7 kommt es zu einer Expression in allen Bereichen, die morphogenetische Bewegungen zeigen; eine erhöhte Expression ist im Bereich des posterioren Mitteldarm-Primordiums, das die Keimzellen umschließt, nachweisbar. Bis Stadium 7-8 bleibt die Expression in diesen Geweben hoch, gleichzeitig kommt es zu einer Expression im Primordium des anterioren Mitteldarms (Abb. 31 C-E).

In Stadium 10 kommt es zu einem starken Anstieg der Expression im Mesoderm (Abb. 31 F). Die Expression ist bis zum Stadium 14 nachweisbar (Abb. 31 G). In diesem Stadium kommt es auch zu einer Expression im visceralen Mesoderm entlang des Darmes. Zugleich ist in der lateralen Ansicht die Expression von *CG6817* im Nervensystem zu erkennen (Abb. 31 H). Eine Unterscheidung zwischen einer neuronalen oder glialen Expression war nicht eindeutig möglich. Zum Ende der Embryogenese nimmt die Expression leicht ab. Im Stadium

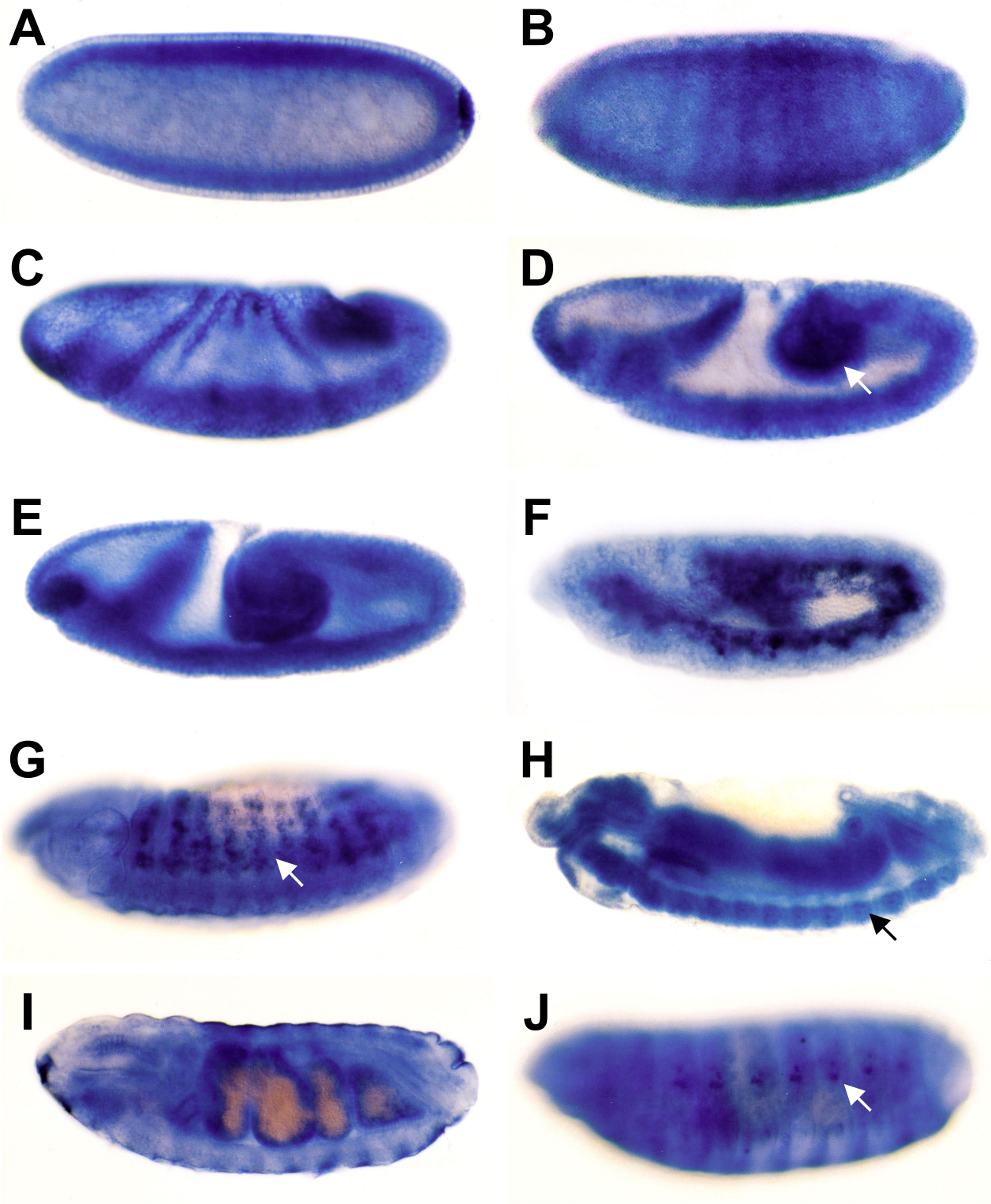


Abb. 31 Das mRNA Expressionsmusters von *kätchen/CG6817*. Das mRNA Expressionsmuster wurde durch Hybridisierung mit einer spezifischen DIG-markierten *anti-sense* Sonde von *CG6817* an *whole-mount* Embryonen bestimmt. Anterior ist links, dorsal oben. Die mRNA Expression von *kätchen/CG6817* wird dynamisch reguliert. In Stadium 5 Embryonen ist die maternale Komponente der mRNA und die Expression in den Keimzellen gut zu erkennen. Während früher Entwicklungsstadien ist die Expression des Transkriptes besonders hoch im Bereich der Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms und der somatischen Muskulatur (C-G). In Stadium 14 Embryonen kommt es zu einer Expression im ZNS. Aufgrund der Anzahl und Lage könnte es sich bei den stärker exprimierenden Zellen um ML-Gliazellen handeln (H, Pfeil). Am Ende der Embryogenese kommt es zu einer starken Expression im gesamten Darm (I) und in einigen lateralen Zellen.

Ergebnisse

16 ist aber noch immer eine starke Expression im Bereich des Darmes nachweisbar. Zum gleichen Zeitpunkt kommt es auch zu einer distinkten Expression in einigen lateralen Zellen (Abb. 31 J). Die Identität dieser Zellen kann alleine aufgrund der *in-situ* Hybridisierung nicht geklärt werden, es könnte sich aber um Zellen des peripheren Nervensystems handeln.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass eine basale Expression des *CG6817*-Transkripts in allen Geweben während der gesamten Embryogenese nachweisbar ist. Es kommt zu einer dynamischen Hochregulation der Expression zu bestimmten Zeitpunkten in verschiedenen Geweben wie z. B. im Nervensystem und im Mesoderm.

3.3.3.2 Analyse des Expressionsmusters der Enhancer Trap Insertion *kas^{l(3)j8E8}*

Das *kästchen* P-Element *kas^{l(3)j8E8}* ist in 5'-3' Orientierung innerhalb des 5'UTR (1. Exon) des Gens *CG6817* inseriert. Bei dem P-Element handelt es sich um ein P[*lacW*], das ein β -Galaktosidase Gen im 5' Bereich beinhaltet. Das Expressionsmuster der kernständigen β -Galaktosidase wird durch Enhancer-Elemente des Insertionsort reguliert und spiegelt, zumindest partiell, die endogene Expression eines Gens wieder, wenn die Insertion innerhalb des 5' Bereichs erfolgt ist. Die Expression der β -Galaktosidase des P-Elements *kas^{l(3)j8E8}* kann folglich zur Analyse des Expressionsmusters von *CG6817* genutzt werden.

Die Expression der β -Galaktosidase beginnt in Stadium 10 in lateralen Epidermiszellen aller abdominalen Segmente. Gleichzeitig ist eine starke Expression in den Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms zu erkennen (Abb. 32 A). Ab Stadium 12 wird die β -Galaktosidase zusätzlich in Zellen des ZNS exprimiert. Während die Expression in den lateralen Epidermiszellen in späteren Stadien leicht abnimmt, findet man eine starke Expression im ZNS und in Teilen des Darms (Abb. 32, C). Präparationen des ventralen ZNS zeigen die regelmäßige Anordnung der β -Galaktosidase-positiven Zellen. In jedem Segment findet man eine starke Expression in einem lateralen Zellecluster und in 4 Zellen entlang der Mittellinie (Abb. 32 D). Durch eine konfokale Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker anti-Elav konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen ausschließlich um Neurone handelt (Daten nicht gezeigt).

Zur genaueren Analyse der β -Galaktosidase exprimierenden Zellen wurde eine konfokale Doppelfärbung mit einem anti-Invected Antikörper durchgeführt, der die posterioren Zellen aller Segmente markiert. Nur im dorsalen Bereich der Segmente konnte eine Kolokalisation der beiden Marker in epidermalen Zellen festgestellt werden. Auffällig

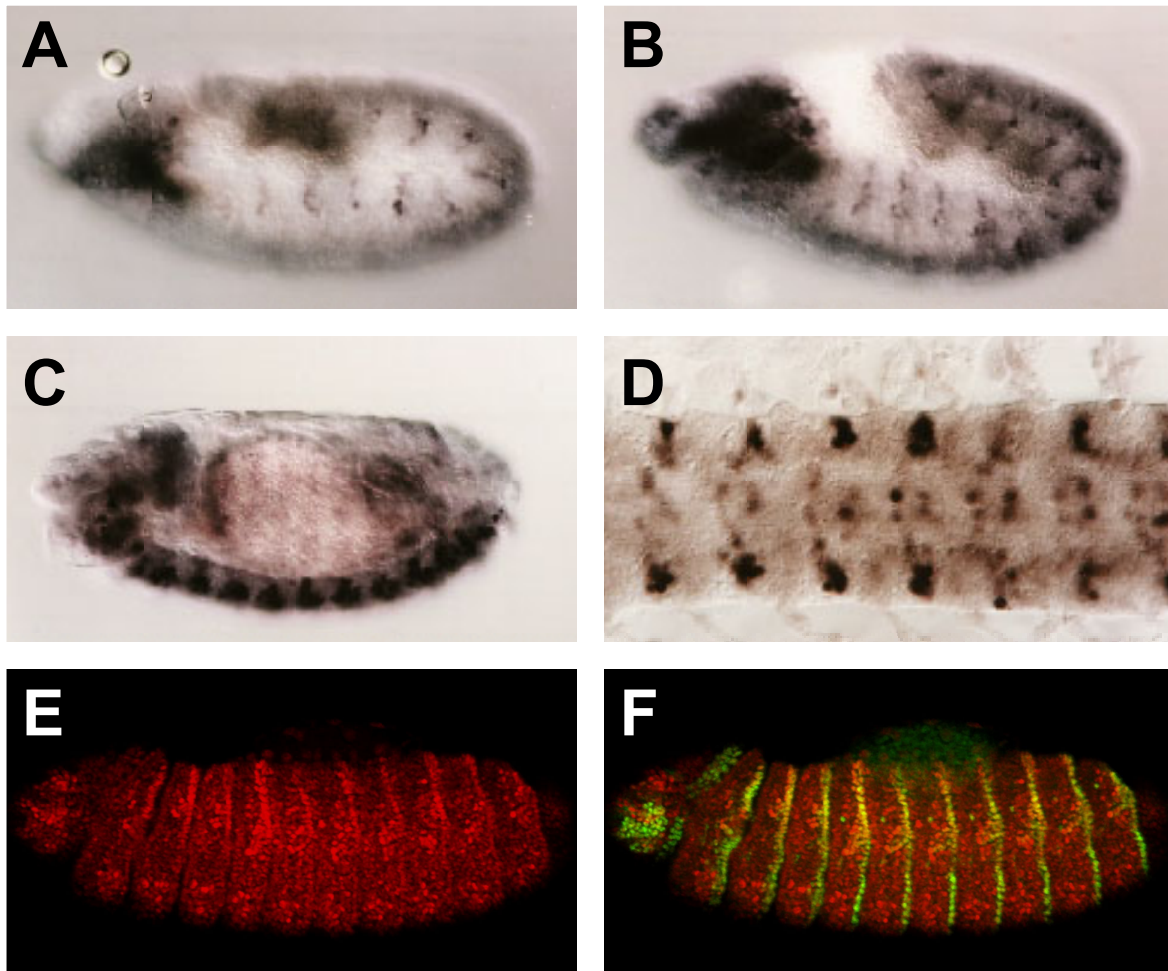


Abb. 32 Das Expressionsmuster der Enhancer Trap Insertion $kas^{(3)j8E8}$. (A-C, E, F) Laterale Ansichten von *whole-mount* Embryonen unterschiedlichen Alters, anterior ist links. Alle hier dargestellten Embryonen sind homozygot für die P-Element Insertion, da die β -Galaktosidase-Expression in heterozygoten Embryonen nur sehr schwach ist. Die P-Element Insertion $kas^{(3)j8E8}$ schränkt die *kästchen* Funktion ein, so dass es zu leichten Defekten in den analysierten Geweben (z.B. im ZNS, D) kommt.

(A) Die β -Galaktosidase-Expression beginnt in Stadium 11 und markiert laterale Epidermiszellen in jedem abdominalen Segment. Zugleich kommt es zu einer starken Expression im presumptiven anterioren und posterioren Mitteldarm. (B) Ab Stadium 12 ist eine Expression im zentralen Nervensystems erkennbar. (C) In Stadium 15 kommt es zu einer starken Expression innerhalb des ZNS. Im Bereich des Darmes ist nur noch eine schwache Expression zu erkennen. (D) Die Präparation des ZNS zeigt ein gleichmäßiges Muster β -Galaktosidase exprimierender Zellen; neben lateralen Neuronen sind auch 4 Zellen pro Segment entlang der ventralen Mittellinie gefärbt.

(E, F) Konfokale Darstellung der β -Galaktosidase Expression (rot) und des mAb anti-Invected (grün). Im dorsalen Bereich kommt es zu einer Kolokalisation der beiden Marker in den posteriorsten Zellen des Segmentes. Die konfokale Färbung zeigt, dass in nahezu allen Zellen eine basale Expression vorhanden ist, es aber in definierten Zellen zu einer erhöhten Expression kommt. Interessanterweise findet sich die Expression der beiden Marker häufig in benachbarten Zellen (z.B. im Kopfbereich, F).

Ergebnisse

ist, dass sich die β -Galaktosidase exprimierenden Zellen häufig in direkter Nachbarschaft zu den Inverted-positiven Zellen befinden (z. B. in der Kopfregion, Abb. 32 F).

Das mRNA-Expressionsmuster von *CG6817* zeigt eine große Übereinstimmung mit dem β -Galaktosidase-Expressionsmuster der Enhancer Trap Insertion *kas^{l(3)j8E8}*. Die Expressionsdaten lassen sich gut mit den beobachteten *kästchen* Phänotypen des Nervensystem, des Darmes und der Muskulatur korrelieren.

3.3.4 Postembryonale Funktionen von *kästchen*

3.3.4.1 *kästchen* wird für die Entwicklung der Photorezeptoren benötigt

Da die *kästchen* EMS-Mutationen zu embryonaler Letalität führen, wurden die Mutationen *kas^{B1-89}* und *kas^{O1-41}* auf FRT-Chromosomen rekombiniert, um postembryonale Funktionen von *kästchen* untersuchen zu können. Die *kästchen* Mutation *kas^{B1-89}* wurde auf einem Chromosom erzeugt, das die P-Element Insertion *P[w⁺, lacW]AA142* als Marker für ML-Gliazellen trägt. Diese Insertion befindet sich in der direkten Umgebung der *kästchen* Mutation (Pielage, 1999) und konnte somit bei der Erzeugung des FRT-*kas^{B1-89}* Chromosoms nicht von der *kästchen* Mutation getrennt werden. Alle *kas^{B1-89}* Klone sind folglich homozygot für die P-Element Insertion *AA142* und das mutante Gewebe ist nicht, im Gegensatz zu *kas^{O1-41}* Klonen, *white⁻* markiert.

kästchen mutante Klone wurden mit Hilfe verschiedener Flipase-Expressionen und einem *Minute* Gegenchromosom induziert (siehe Abschnitt 3.2.3.5), so dass die resultierenden *kästchen* Klone relativ groß waren. Der Verlust von *kästchen* in der Augenscheibe (*eyFlp*) wurde zunächst mit dem Antikörper anti-Elav analysiert, der die Zellkerne aller Photorezeptorzellen markiert (Abb. 33). Der Antikörper ermöglicht eine genaue Analyse des Fortschreitens der morphogenetischen Furche und der Differenzierung der Photorezeptoren. Im Wildtyp ist die Entwicklung der Photorezeptorcluster gut zu erkennen (Abb. 33 A). Die morphogenetische Furche befindet sich anterior der ersten Elav-positiven Zellen, die gleichmäßig in einer Reihe angeordnet sind (Abb. 33 A). Die verwendeten Chromosomen ermöglichten keine Markierung der klonalen Grenzen; die mit der *eyFlp*-Technik erzeugten Klone sind jedoch relativ groß (siehe Abschnitt 3.2.3.5).

Es wurden eine größere Anzahl mutanter Augenimaginalscheiben ($n > 12$) für die beiden Allele *kas^{B1-89}* und *kas^{O1-41}* untersucht. Die resultierenden Phänotypen sind aufgrund der unterschiedlichen Klongrößen nicht gleich stark, qualitativ unterscheiden sie sich jedoch

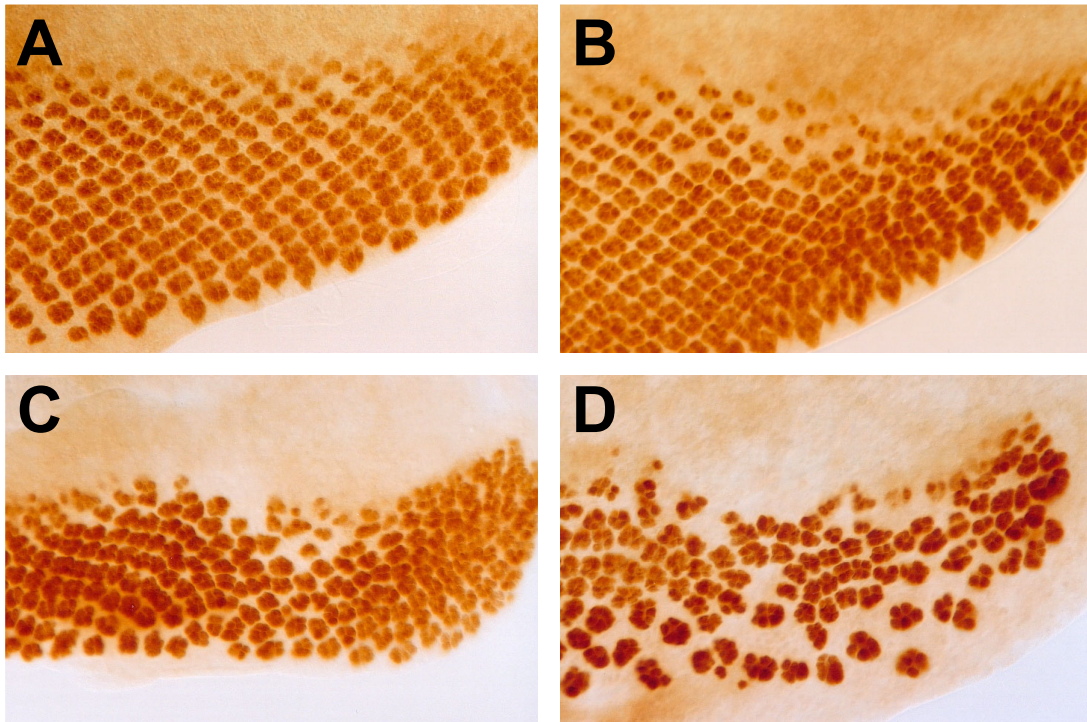


Abb. 33 *kästchen* betrifft die Wanderung der morphogenetischen Furche. Präparationen von Augenimaginalscheiben, anterior ist oben. Die Zellkerne der Photorezeptoren wurden mit dem mAb anti-Elav markiert. (A) Wildtyp; (B) *eyFlp kas^{O1-41}*; (C, D) *eyFlp kas^{B1-89}*. Der Verlust von *kästchen* führt zu einem vorzeitigen Stoppen der Wanderung der morphogenetischen Furche (B-D). Zugleich kommt es zu einer Störung der Photorezeptorentwicklung (C, D).

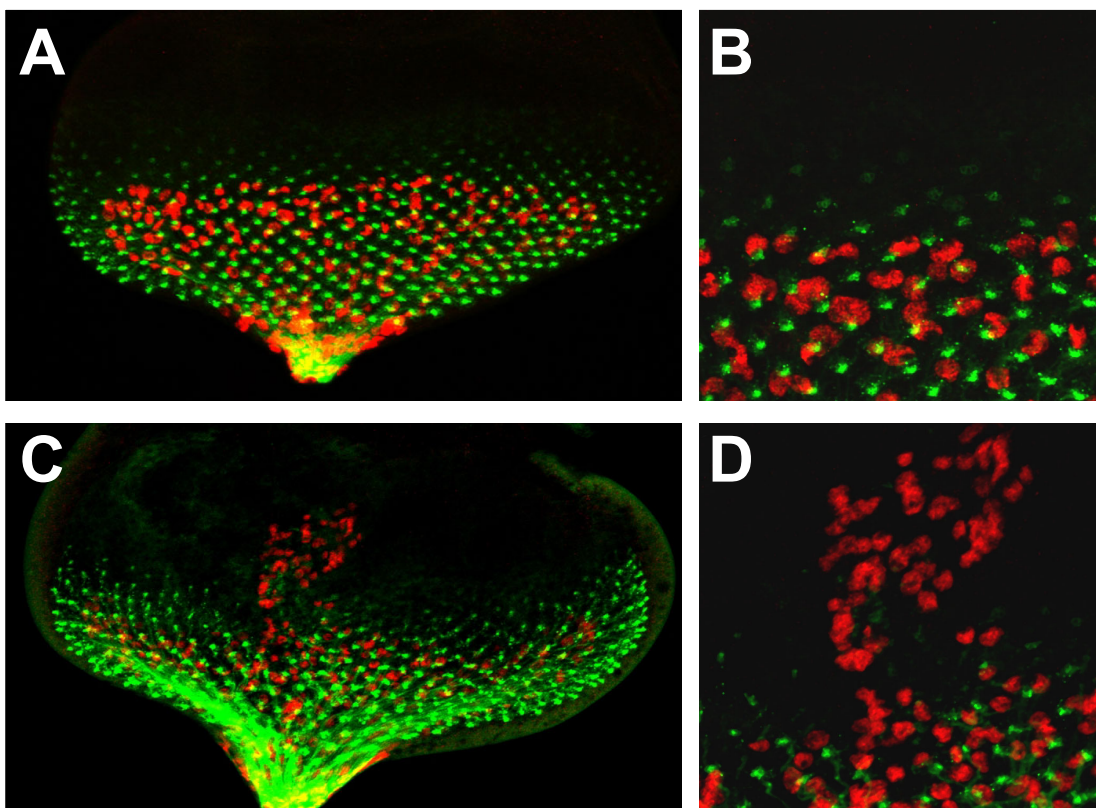


Abb. 34 *kästchen* kontrolliert die Migration der Gliazellen. Präparationen von Augenimaginalscheiben, anterior ist oben. Die Zellkerne der Gliazellen wurden mit dem mAb anti-Repo (rot) und die Axone der Photorezeptorzellen mit anti-HRP (grün) markiert. (A, B) Wildtyp; (C, D) *eyFlp kas^{B1-89}*. Fehlt *kästchen* in der Augenimaginalscheibe, so respektieren die Gliazellen die anteriore Grenze nicht mehr und wandern über die Photorezeptorzellen und die morphogenetische Furche hinaus (C, D).

Ergebnisse

nicht. Der eindeutigste Defekt ist die Störung der Wanderung der morphogenetischen Furche. In allen untersuchten Augenscheiben findet die Differenzierung der Photorezeptorzellen nicht entlang einer Linie senkrecht zur anterior-posterioren Achse statt (Abb. 33 B, C). Zugleich kommt es zu einer gewissen Unordnung der Photorezeptorcluster innerhalb der Scheibe. Im extremsten Fall (nur bei *kas*^{B1-89} beobachtet) kommt es zu einer kompletten Störung der Augenimaginalscheibendifferenzierung und einem Verlust der regelmäßigen Anordnung der Photorezeptorcluster (Abb. 33 D). *kästchen* wird für das Fortschreiten der morphogenetischen Furche und die Differenzierung der Photorezeptorzellen benötigt.

3.3.4.2 *kästchen* kontrolliert die Migration der Gliazellen

Während der Entwicklung der Augenimaginalscheibe kommt es zu einer Interaktion zwischen den neuronalen Photorezeptorzellen und den Gliazellen, die in die Augenimaginalscheibe einwandern. Kurz nach der Differenzierung der ersten Photorezeptorzellen im posterioren Bereich der Augenimaginalscheibe, senden die Photorezeptoren ihre axonalen Projektionen durch den optischen Stiel in die optischen Loben des larvalen Gehirns. Erst die Differenzierung und axonale Projektion der Photorezeptorzellen ermöglicht eine Migration der Gliazellen vom optischen Stiel in die Augenimaginalscheibe. Die Gliazellen migrieren entlang der axonalen Projektionen der Photorezeptorzellen und bleiben immer mit den Axonen assoziiert. Im Wildtyp stoppt die Migration der Gliazellen vor der morphogenetischen Furche im Bereich der anterioren Photorezeptorzellen. Die Zellkerne der Gliazellen, die durch den anti-Repo Antikörper markiert wurden, befinden sich deutlich hinter den ersten Axonen der Photorezeptorzellen, die mit einem anti-HRP Antikörper markiert wurden. (Abb. 34 A) In der Ausschnittsvergrößerung ist die regelmäßige Anordnung von Axonen und Gliazellen deutlich zu erkennen (Abb. 34 B).

In der Augenimaginalscheibe findet, analog zur Situation im Embryo, eine sehr kontrollierte Interaktion zwischen neuronalen Axonen und migrierenden Gliazellen statt. Induziert man mutante *kästchen* Klone mit der *eyFlp*-Technik, so betreffen diese Klone ausschließlich die neuronalen Photorezeptorzellen und nicht die Gliazellen, die nicht innerhalb der *eyeless* Domäne entstehen und erst später in die Augenscheibe migrieren. In *kästchen* mutanten Augenscheibe erkennen die Gliazellen die anteriore Grenze nicht mehr und wandern über die Photorezeptorzellen und die morphogenetische Furche hinaus (Abb. 34 C). In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass besonders in dem Bereich, durch den die Gliazellen wandern, die Differenzierung der Photorezeptoren gestört ist und keine einheitliche

Ergebnisse

Linie relativ zur morphogenetischen Furche existiert (Abb. 34 D). *kästchen* wird für die Kontrolle der Migration der Gliazellen in die Augenscheibe benötigt.

Ein ähnlicher Phänotyp ist bisher nur für die Gene *hedgehog* (*hh*), *gilgamesh* (*gish*), *eyeless* und *sine oculis* beschrieben worden. Hierbei werden *eyeless* und *sine oculis* generell für die Differenzierung der Augenscheibe benötigt; *hh* und *gish* kontrollieren sowohl die Wanderung der morphogenetischen Furche als auch die Differenzierung der Photorezeptorzellen (Hummel et al., 2002). Die Übereinstimmung der *kästchen* Phänotypen mit den Phänotypen von *hh* und *gish* deuten auf eine mögliche Interaktion von *kästchen* mit diesen Genen hin.

3.3.4.3 *kästchen* ist an der Augen- und Kopfentwicklung beteiligt

Der Verlust von *kästchen* während der Entwicklung der Augenimaginalscheibe hat weitreichende Konsequenzen für die Entwicklung der adulten Augen. Übereinstimmend mit den Befunden der mutanten Augenimaginalscheiben zeigen die anterioren Bereiche der Augen stärkere Defekte als die posterioren Bereiche (Abb. 35 C, E). Der Phänotyp ist auf die Störung der Wanderung der morphogenetischen Furche zurückzuführen. In extremen Fällen kommt es im anterioren Bereich der Augen zu einer Differenzierung epithelialer Strukturen, die Borsten beinhalten können (Abb. 35 C). Generell sind die Augen im anterioren Bereich reduziert, bei dem starken *kästchen* Allel *kas*^{B1-89} kommt es zu einer Reduzierung des gesamten Auges (Abb. 35 C). Identische Phänotypen wurden auch bei *hsFlp* induzierten *kästchen* Augenklonen beobachtet. Auch wenn der *hsFlp*-induzierte Klon nur kleine Bereiche des Auges betraf, war immer der anteriore Bereich des *kästchen* Klons stärker betroffen als der posteriore Bereich (Daten nicht gezeigt).

Die *eyFlp* induzierten Klone zeigen noch einen weiteren interessanten Aspekt. Da innerhalb der *eyeless* Domäne auch die Anlage der dorsalen Kopfkutikula liegt, konnten mögliche Funktionen von *kästchen* für die Entwicklung dieses Gewebes untersucht werden. Der Verlust von *kästchen* führt zu einem Verlust aller Sinnesorgane, der Borsten und Ocelli des dorsalen Kopfes (Abb. 35 D). Die Ausprägung des Phänotyps ist wieder von der Größe des induzierten Klons abhängig. In Abbildung 35 D ist einer der stärksten Phänotypen, die mit *kas*^{O1-41} induziert werden konnten, dargestellt. Es kommt aber immer (n>100) zu einem partiellen Verlust der Borsten und Ocelli. In *kas*^{B1-89} Klonen ist auch dieser Phänotyp stärker ausgeprägt, neben dem Verlust der Borsten und Ocelli kommt es zu einem generellen Verlust der Kopfkutikula, der Abstand zwischen den beiden Augen ist deutlich verkleinert (Abb. 35

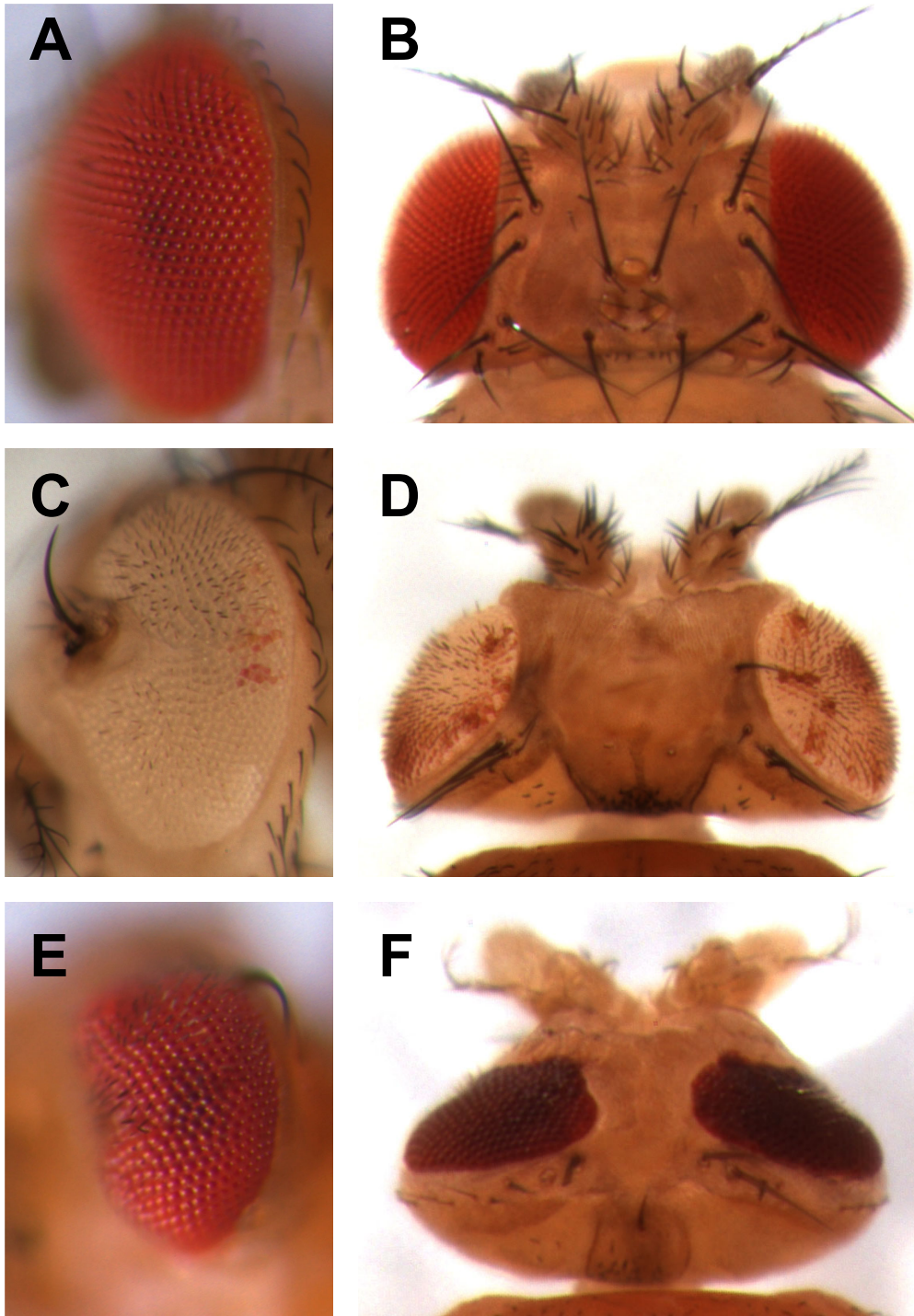


Abb. 35 Adulte *kästchen* Phänotypen I. (A, C, E) Laterale Ansicht eines Komplexauges, anterior ist links. (B, D, F) Aufsicht auf die dorsale Kopfregion, anterior ist oben. (A, B) Wildtyp; (C, D) *eyFlp kas^{O1-41}*; (E, F) *eyFlp kas^{B1-89}*. Die *kästchen* mutanten Ommatidien sind bei *kas^{O1-41}* weiß; bei *kas^{B1-89}* kann nicht zwischen mutantern und wildtypischem Gewebe unterschieden werden. Da in *kästchen* mutanten Augenimaginalscheiben die Wanderung der morpho-genetischen Furche gestört ist, kommt es zu einer Reduktion der anterioren Bereiche des Auges (C, E). Im anterioren Bereich kann es zur Ausbildung ektopischer Borsten kommen (C). Der Verlust von *kästchen* im Bereich des dorsalen Kopfes führt zu einem Verlust der Ocelli und der Borsten. Bei *kas^{B1-89}* ist der Abstand zwischen den Augen deutlich verringert.

Ergebnisse

F). Interessanterweise ist wiederum der Hh-Signaltransduktionsweg an der Determinierung der Ocelli und Borsten des Kopfes beteiligt (Amin et al., 1999).

3.3.4.4 *kästchen* ist an der Flügel- und Kopfentwicklung beteiligt

Bei der Induktion von *hsFlp* Klonen kommt es nicht nur zu *kästchen* mutanten Zellklonen im Auge sondern auch in anderen adulten Geweben wie dem Thorax und den Flügeln. Der Thorax wird vom proximalen Bereich der beiden Flügelimaginalscheiben gebildet, die an der dorsalen Mittellinie des Thorax miteinander fusionieren. Sobald *kas*^{B1-89} Klone größere Bereiche der proximalen Flügelimaginalscheibe betreffen, kommt es zu Defekten beim thorakalen Schluß (Abb. 36 B, C). In den *kästchen* mutanten Bereichen des Thorax kommt es zu einem Verlust eines Großteils der Mikro- und Makrochaeten und die restlichen Borsten sind nicht mehr wildtypisch verteilt (Abb. 36 B, C). Sowohl bei der Kopfentwicklung als auch bei der Thoraxentwicklung ist *kästchen* für die Entstehung und Positionierung von Sinnesorganen (Ocelli und Borsten) verantwortlich.

In den Flügeln, die sich aus dem distalen Bereich der Flügelscheibe entwickeln, führt der Verlust von *kästchen* häufig zu einem Verlust des Flügelrandes (Abb. 36 E, F). Zudem entspricht die Größe der einzelnen Flügel-Kompartimente nicht dem Wildtyp. So kommt es z. B. zu einer Vergrößerung des Bereichs zwischen den Flügelvenen L2 und L3 (Abb. 36 F). Sehr große *kas*^{B1-89}-Klone führen zur Bildung von Blasen und einem kompletten Formverlust des Flügels (Abb. 36 G).

3.3.5 Analyse der maternalen *kästchen* Komponente

Da die Expressionsdaten von *CG6817* eine starke maternale Komponente des Transkriptes gezeigt haben, wurden die *kästchen* FRT-Chromosomen genutzt, um mit Hilfe der *ovoD*-Methode (Chou and Perrimon, 1996) den gleichzeitigen Verlust von maternaler und zygotischer *kästchen* Funktion zu analysieren. Die aus den Keimbahnklonen resultierenden Embryonen wurden anhand einer Kutikulapräparation auf Entwicklungsdefekte untersucht. In einer ventralen Ansicht ist im Wildtyp die segmentale Anordnung der Zähnchenbänder zu erkennen. In jedem Segment ist nur der anteriore Bereich mit Zähnchenbändern bedeckt (Abb. 37 A). Für das Allel *kas*^{B1-89} konnten nur sehr wenige Embryonen erzeugt werden. Dies deutet auf eine zusätzliche Funktion von *kästchen* bei der Oogenese hin. Bei den verbleibenden *kas*^{B1-89} Embryonen konnte nicht zwischen maternal und zygotisch mutanten Embryonen und Embryonen, die ein paternales Wildtyp-Chromosom besitzen, unterschieden

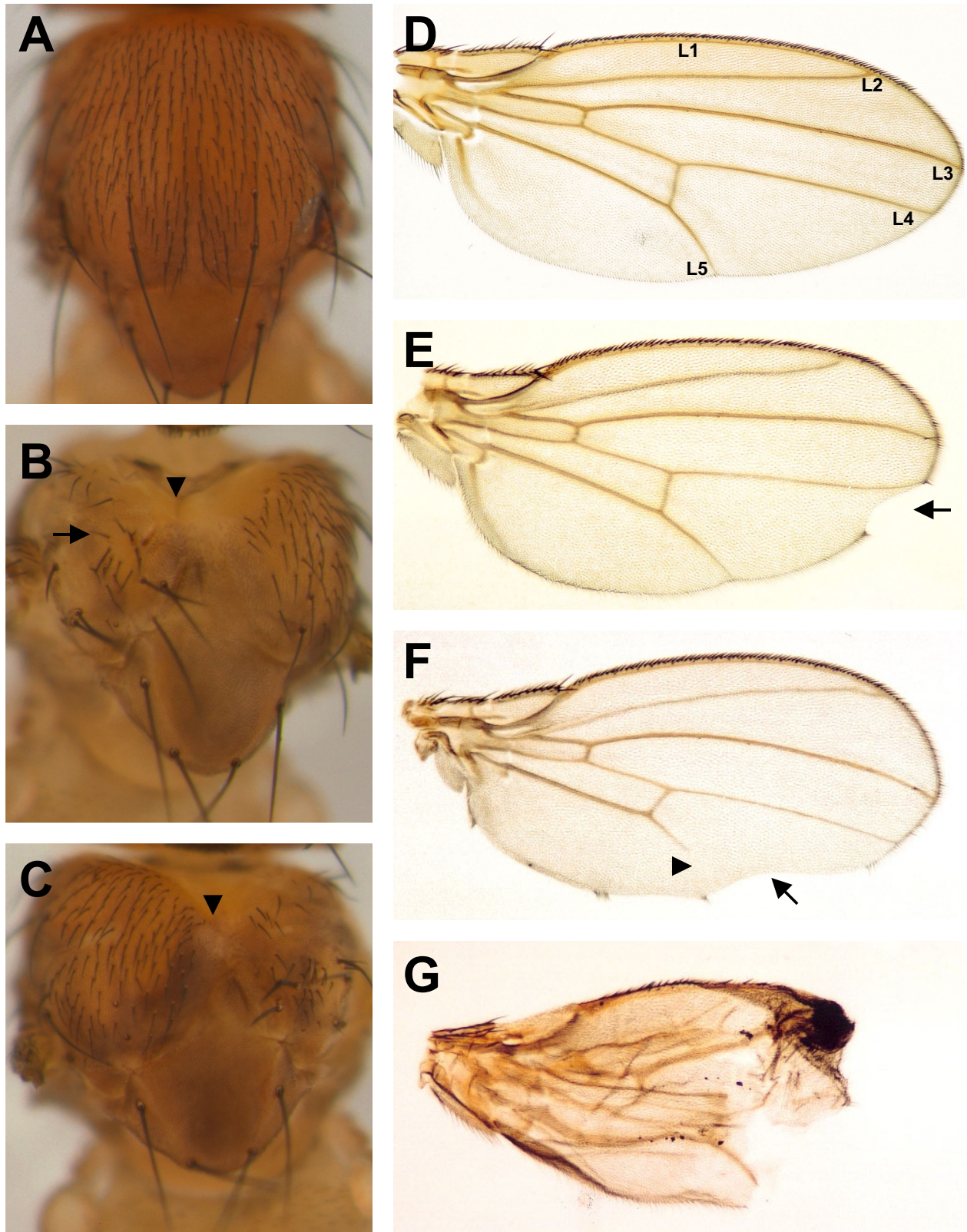


Abb. 36 Adulte *kästchen* Phänotypen II. Analyse des Verlustes von *kästchen* für die Thorax- und Flügelentwicklung. (A-C) Dorsale Ansicht des Thorax, anterior ist oben; (D-G) Präparation der Flügel, anterior ist oben. (A, D) Wildtyp; (B, C, E-G) *hsFlp kas^{B1-89}*. In *kästchen* Klonen, die den Thorax betreffen kommt es zu zwei Phänotypen. Analog zu dem Phänotyp im dorsalen Kopfbereich kommt es zu einem Verlust von Macro- und Microchaeten (B, C, Pfeil). Gleichzeitig kommt es zu Defekten des thorakalen Schlusses (B, C, Pfeilspitzen). *kästchen* mutante Klone in den Flügeln führen zu einem Verlust des Flügelrandes (E, F, Pfeile) oder einzelner Flügelvenen (F, Pfeilspitze). Flügel mit sehr großen *kästchen* Klonen sind deformiert (G).

Ergebnisse

werden. Die analysierten Embryonen ($n = 12$) zeigten unterschiedlich starke Phänotypen. Bei einigen Embryonen kommt es zu einem vollständigen Verlust der Kutikula, es verbleiben nur diffuse Reste des Embryos (Abb. 37 C). Andere Embryonen zeigen Defekte sowohl bei der Differenzierung der Kutikula als auch beim Keimstreifrückzug. Die Embryonen sind stark verkrüppelt und nur vereinzelt sind Zähnchenbänder auszumachen, die keine segmentale Anordnung mehr zeigen (Abb. 37 D). Zudem gibt es Embryonen, bei denen es zu einem Verlust einzelner Segmente kommt. Es sind nur noch Zähnchenbändern von 4 Abdominalsegmenten zu erkennen (Abb. 37 E). Die Variabilität der Phänotypen kommt möglicherweise durch eine partielle Rettung des *kästchen* Phänotyps durch das paternale, wildtypische Chromosom zustande.

Für das hypomorphe *kästchen* Allel kas^{O1-41} konnten zahlreiche Keimbahnklone hergestellt werden. Bei dieser *kästchen* Mutation kann der Verlust der maternalen Komponente durch die paternale, wildtypische *kästchen* Kopie zur Vitalität gerettet werden. Die paternal geretteten Tiere konnten eindeutig anhand des verwendeten Balancers identifiziert werden. kas^{O1-41} Keimbahnklone zeigten eine noch größere phänotypische Varianz als kas^{B1-89} Keimbahnklone. Allerdings kam es bei beiden Mutationen zu identischer Phänotypen. Auch bei kas^{O1-41} findet man Embryonen, die nur noch rudimentäre Kutikula-Reste besitzen (Abb. 37 F), Embryonen, die einen starken Keimstreifrückzugsdefekt (Abb. 37 G, H) und Embryonen, bei denen einzelne Segmente vollständig fehlen. Dieser „Paarregelphänotyp“ ist relativ häufig zu beobachten. In einigen maternal und zygotisch mutanten Embryonen findet man den Verlust einzelner Segmentkompartimente (Abb. 37 J, K). Dieser Phänotyp ähnelt in einigen Aspekten dem Phänotyp von *hedgehog* Mutationen (siehe zum Vergleich Abb. 37 B, die amorphe *hedgehog* Mutation hh^{4C}). Die Kutikula-Analyse der Keimbahnklone zeigte eine starke Variabilität der *kästchen* Phänotypen, so dass eine eindeutige Einordnung in einen Signaltransduktionsweg nicht möglich ist.

Die Analyse des Nervensystems in maternal und zygotisch mutanten *kästchen* Embryonen konnte aufgrund der geringen Anzahl der Embryonen bei kas^{B1-89} nur mit der Mutation kas^{O1-41} durchgeführt werden. Auch hinsichtlich der ZNS-Phänotypen kommt es zu einer großen phänotypischen Varianz bei den *kästchen* Keimbahnklonen. Die stärkste phänotypische Klasse führt zu einem völligen Verlust der Gestalt des Embryos und das Nervensystem ist nicht als einheitliche Struktur erkennbar. Es kommt aber zur Differenzierung neuronaler Zellen, die anhand der Expression des HRP-Epitops eindeutig erkannt werden können (Abb. 38 C). Eine zweite phänotypische Klasse umfaßt Embryonen,

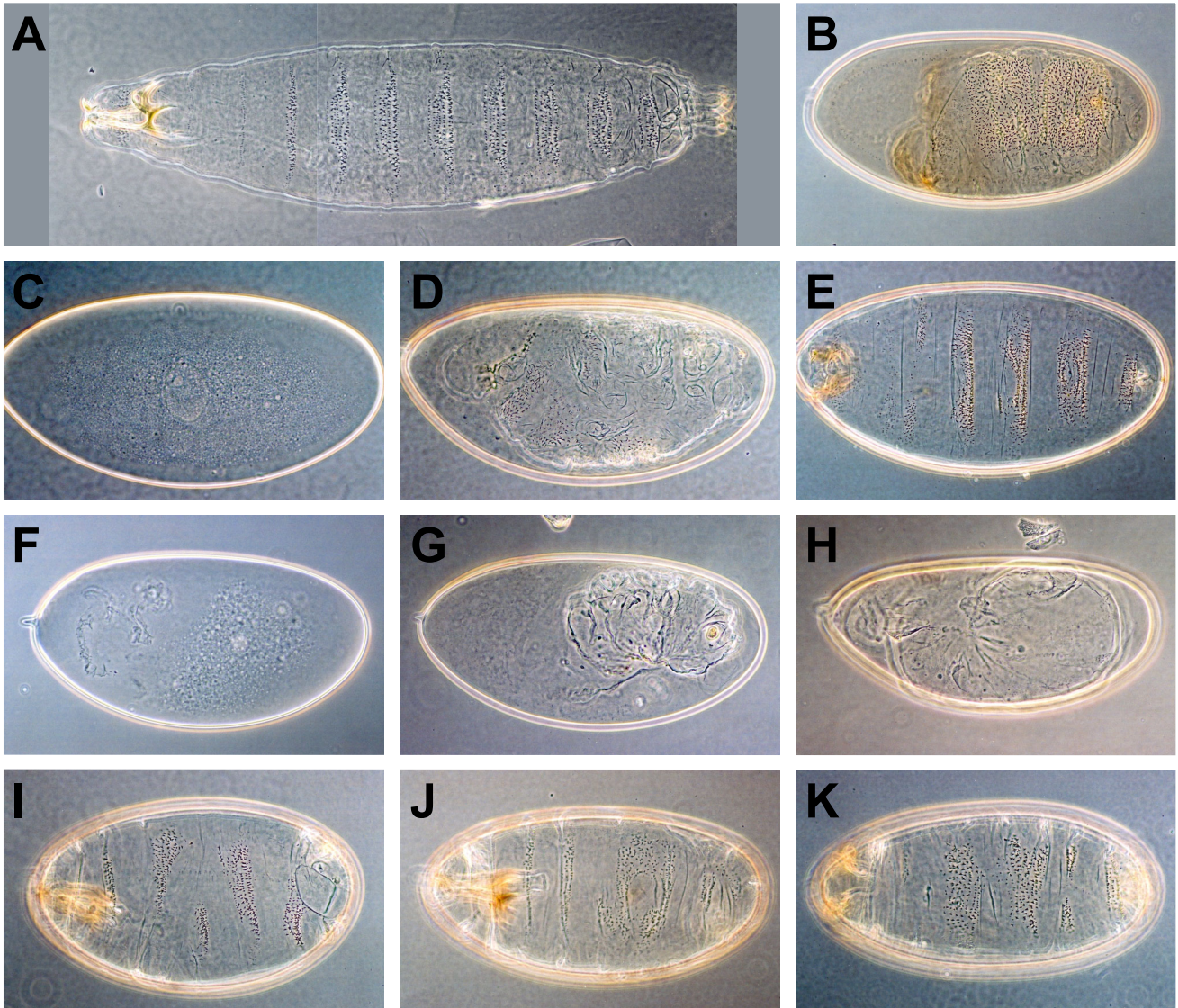


Abb. 37 Analyse der maternalen Funktion von *kätchen*. Ventrale Ansichten von Kutikula-Präparationen von *whole-mount* Embryonen, anterior ist links. (A) Wildtyp (Photomontage); (B) *hh^{AC}*; (C-E) *kas^{B1-89}* Keimbahnklone; (F-K) *kas^{O1-41}* Keimbahnklone. Der Beitrag der maternalen Komponente von *kätchen* wurde durch Keimbahnklone analysiert. Der gleichzeitige Verlust der maternalen und zygotischen Funktion von *kätchen* führt zu variablen Defekten bei der Embryogenese. Teilweise kommt es zu einem Verlust aller Kutikulastrukturen (C, F). In einer weiteren phänotypischen Klasse kommt es zu Keimstreifrückzugsdefekten (D, G, H). Bei der numerisch größten Gruppe kommt es zu starken Segmentierungsdefekten. Es kommt zu einem Verlust ganzer Segmente (E, I) bzw. zu einer Fusion benachbarter Segmente (K). Einige phänotypische Aspekte dieser Klasse entsprechen einem *hedgehog* Phänotyp (Vergleiche B und K).

Ergebnisse

bei denen es zwar zu einer Differenzierung des Nervensystems kommt, nicht aber zur Ausbildung der Kommissuren oder Konnektive (Abb. 38 D). Des weiteren findet man eine große Anzahl Embryonen, die einen *hedgehog* ähnlichen ZNS-Phänotyp zeigen. Es ist eine gewisse Struktur innerhalb des ZNS erkennbar, die Kommissuren und die Konnektive bilden aber keine einheitliche Verbindung entlang der anterior-posterioren Achse (Abb. 38 E). Ein *hh^{AC}* mutanter Embryo ist zum Vergleich in Abbildung 38 B dargestellt. Die letzte phänotypische Gruppe zeigt einen fusionierten Kommissuren Phänotyp. Es kommt zu einer starken Fusion der Kommissuren und die Konnektive sind nahezu vollständig reduziert.

Die Analyse der maternalen *kästchen* Komponente und der postembryonalen Funktionen von *kästchen* hat gezeigt, dass der Verlust von *kästchen* phänotypische Aspekte verschiedener Signaltransduktionswege widerspiegelt. Sowohl der Augenphänotyp als auch der Phänotyp einiger Keimbahnklone zeigte eine Übereinstimmung mit einem Phänotyp, der durch den Verlust von *hedgehog* zustande kommt. Da zudem die Analyse des Expressionsmusters der *kästchen* Enhancer Trap Insertion *kas^{l(3)j8E8}* eine Expression in den posterioren Zellen der embryonalen Segmente gezeigt hat (Abb. 32) wurde eine mögliche Interaktion von *kästchen* mit *hedgehog* genauer untersucht.

3.3.6 *kästchen* interagiert mit *hedgehog*

Genetische Interaktionen lassen sich am einfachsten in adulten Geweben untersuchen, da z. B. das Auge keine essentielle Struktur für das Überleben der Tiere ist und die Analyse von dosisabhängigen Interaktion möglich ist (Thomas and Wassarman, 1999). Die genetische Interaktion zwischen *kästchen* und *hedgehog* wurde zunächst durch Verwendung des *hedgehog* Allels *hh^{bar3}* (= *hh¹*) getestet. Diese *hedgehog* Mutation betrifft nur die Entwicklung des Auges und ist lebensfähig (Heberlein et al., 1993). Es kommt zu einer Reduktion der Größe des Komplexauges, da eine Wanderung der morphogenetischen Furche nur noch eingeschränkt möglich ist. Es werden nur noch ca. 10 Reihen von Ommatidien entlang der anterior-posterioren Achse determiniert (Heberlein et al., 1993) (Abb. 39 B).

Zur Analyse der Interaktion mit *kästchen* wurden Doppelmutanten mit den Allelen *kas^{B1-89}* und *kas^{D3-66}* hergestellt. Die Doppelmutationen *hh^{bar3} kas^{B1-89}* bzw. *hh^{bar3} kas^{D3-66}* wurden gegen das Allel *hh^{bar3}* zurückgekreuzt, so dass die resultierenden Tiere homozygot mutant für *hh^{bar3}* und heterozygot für die jeweiligen *kästchen* Allele waren. In diesen Tieren kommt es zu einer Verstärkung des *hh^{bar3}* Phänotyps. Statt ca. 10 Reihen bilden sich nur noch etwa 6-7 Reihen Ommatidien (Abb. 39 C, D). *kästchen* interagiert somit genetisch mit

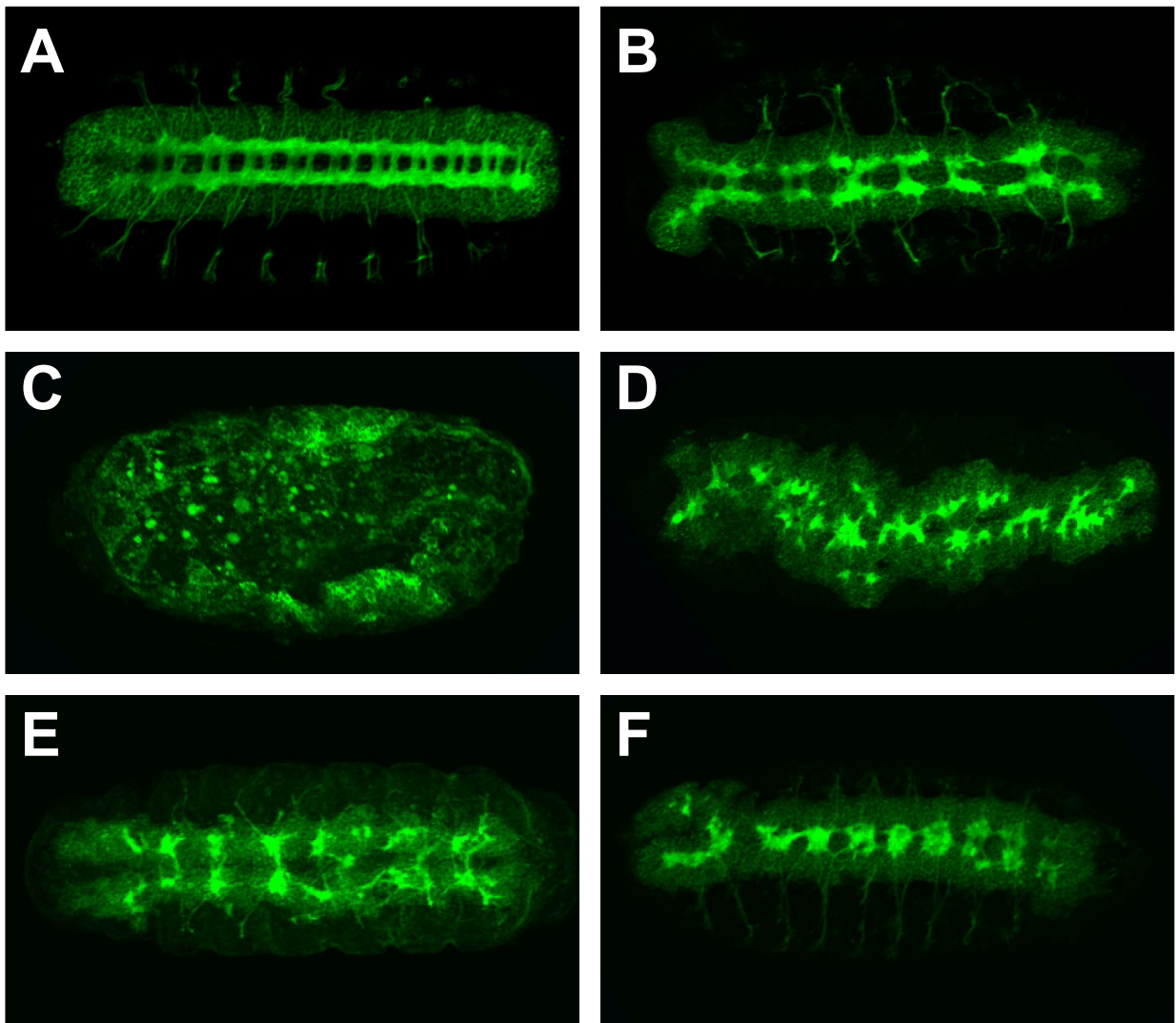


Abb. 38 Analyse der maternalen Funktion von *kästchen II*. Ventrale Ansichten von *whole-mount* Embryonen, anterior ist links. Markierung aller Neurone mit anti-HRP. (A) Wildtyp; (B) *hh^{AC}*; (C-F) *kas⁰¹⁻⁴¹* Keimbahnklone. Der gleichzeitige Verlust der maternalen und zygotischen *kästchen* Komponente führt zu einer starken Beeinträchtigung der Neurogenese und der axonalen Wegfindung. Es kommt zu sehr variablen Phänotypen (C-E). Einige mutante Embryonen zeigen einen *hedgehog*-ähnlichen Phänotyp (Vergleiche B und E)



Abb. 39 *kästchen* interagiert mit *hedgehog*. Laterale Ansichten der Komplexaugen, anterior ist links. (A) Wildtyp; (B) *hh^{bar3}*; (C) *kas^{B1-89} hh^{bar3}/hh^{bar3}*; (D) *kas^{D3-66} hh^{bar3}/hh^{bar3}*. Die Mutation *hh^{bar3}* ist homozygot vital und führt zu einer Reduktion der Augengröße. Es sind nur noch etwa 11 Reihen Ommatidien in der anterior-posterioren Achse vorhanden (B). Fehlt eine Kopie *kästchen* in diesem Hintergrund, so kommt es zu einer Verstärkung des Phänotyps. Die Anzahl der Ommatidien in der medianen Achse reduziert sich auf 7-8 (C, D).

Ergebnisse

hedgehog. Doppelt homozygote Embryonen für ein starkes *kästchen* Allel und ein *hedgehog* Null Allel (*kas*^{B1-89} *hh*^{4C}) zeigen einen *hedgehog* Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des viel stärkeren embryonalen Phänotyps von *hedgehog* im Vergleich zu *kästchen*, läßt dieses Experiment keine Aussage über die Epistasie zwischen den beiden Genen zu.

3.3.7 Entspricht *kästchen* dem Gen *CG6817*?

Viele Daten, u.a. die Analyse der P-Element induzierten Allele, der „jump out“ Allele, der Defizienz *kas*^{A33-4} und das Expressionsmuster, sprechen dafür, das *kästchen* durch das Gen *CG6817* kodiert wird. Es wurden zwei Ansätze gewählt, um eindeutig zu zeigen, dass *kästchen* dem Gen *CG6817* entspricht. Erstens wurde eine Sequenzanalyse der kodierenden Bereiche von *CG6817* in den verschiedenen *kästchen* EMS-Allelen durchgeführt. Zweitens wurde ein UAS-Konstrukt von *CG6817* hergestellt, das zur Generierung von transgenen Fliegen genutzt wurde. Durch die Expression des Konstruktes sollte versucht werden die *kästchen* Phänotypen oder sogar die embryonale Letalität der *kästchen* Mutationen zu retten.

3.3.7.1 Sequenzanalyse der *kästchen* Allele

Die *kästchen* EMS-Allele wurden über ein Balancerchromosom gebracht, das mit einem GFP-Konstrukt markiert ist, *kästchen* mutante Embryonen konnten so selektioniert und für die DNA-Analyse eingesetzt werden. Jeweils 5 Embryonen wurden für eine PCR-Reaktion eingesetzt, das Produkt wurde aufgereinigt und mit entsprechenden Primern sequenziert.

Bei der Mutation *kas*^{B1-89} konnte eine Basenänderung, die zu einem spezifischen Aminosäureaustausch führt, detektiert werden. Das Glycin in Position 661 ist gegen ein Cystein ausgetauscht. Das Glycin 661 ist eine im humanen Homolog konservierte Aminosäure und befindet sich zudem zu Beginn einer putativen Transmembrandomäne (Abb. 41). Der Austausch könnte zu einer Störung der Sekundärstruktur des Proteins führen. Für die Mutation *kas*^{D3-66} konnten zwei Basenänderungen und entsprechende Aminosäureaustausche nachgewiesen werden. Ein Threonin in Position 558 wird durch ein Alanin ersetzt und ein Valin in Position 602 ebenfalls durch ein Alanin. Der T558A Austausch kann zum Verlust einer möglichen Phosphorylierungsstelle des Proteins und somit zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Die Sequenzanalyse des Allels *kas*^{O1-41} steht noch aus. Es kommt zu einem spezifischen Austausch von Aminosäuren des Proteins *CG6817* in den EMS-induzierten *kästchen* Mutationen.

3.3.7.2 Rettung des *kästchen* Phänotyps

Zur genaueren Analyse des Gens *CG6817* wurde die cDNA *RE41071* in den Vektor pUAST kloniert. Es wurde eine direktionale Klonierung über die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *KpnI* (*Asp718*) durchgeführt. Das fertige Konstrukt wurde durch verschiedene Kontrollrestriktionen und eine Sequenzanalyse überprüft. Transgene Fliegen wurden nach einem Standardprotokoll hergestellt. Es konnten 8 unabhängige Insertionen des Konstruktes UAS-*CG6817* isoliert werden. Die Stämme wurden zunächst genutzt, um mögliche Effekte der ektopischen Expression von *CG6817* zu untersuchen. Die Expression einer Kopie von UAS-*CG6817* mit verschiedenen Treiberlinien (u.a. *da-GAL4*, *ey-GAL4*) führte weder zu Letalität noch zu einem sichtbaren adulten Phänotyp. Daraufhin wurde ein doppelt-homozygoter UAS-*CG6817* Stamm mit Insertionen auf dem 2. und 3. Chromosom hergestellt. Kreuzt man diesen Stamm gegen den ubiquitären Treiber *da-GAL4*, so kommt es zur Letalität im dritten Larvalstadium bzw. frühen Puppenstadium. Andere Treiberlinien führten zu keinem Phänotyp.

Die gewebespezifische Expression eines Transkriptes im genetischen Hintergrund einer Mutationen kann genutzt werden, um den Phänotyp der Mutation zu revertieren. Zugleich kann eine solche Analyse zelltypspezifische Funktionen eines Gens aufdecken. Für die Analyse wurden Rekombinanten der *kästchen* EMS-Allele mit verschiedenen Treiberlinien und mit der dritschromosomalen Insertion UAS-*CG6817*² hergestellt. Die positiven Rekombinationsereignisse wurden anhand der Augenfarbe der UAS-*CG6817*² Insertion und der Letalität in Transheterozygose zu einem anderen *kästchen* Allel bestimmt. Bei den rekombinanten Chromosomen der *kästchen* EMS-Allele und der *kästchen* Deletion *kas*^{A33-4} mit UAS-*CG6817*² tritt ein ungewöhnliches Phänomen auf. Die Anwesenheit von 2 Kopien UAS-*CG6817*² in den homozygoten Tieren führt zu einer partiellen Rettung der *kästchen* Letalität, obgleich die Transkription nicht mit einem GAL4-Stamm aktiviert wurde.

Hierfür könnte eine basale Expression des Transkriptes verantwortlich sein, die sowohl durch den endogenen *heat-shock* Promotor, als auch durch eine hohe Transkriptionsaktivität im Bereich der Insertion zustande kommen kann. Diese „untypische“ Rettung führte dazu, dass bisher keine Standard-Rettungsexperimente durchgeführt werden konnten. Die Experimente werden momentan mit einer weiteren, unabhängigen Insertion des UAS-*CG6817* Konstruktes wiederholt. Die neuen Rekombinanten sollen auch zur Klärung zellspezifischer Funktionen von *kästchen/CG6817* genutzt werden.

Ergebnisse

Die Experimente haben gezeigt, dass die zusätzliche (wenngleich ungewöhnlich erreichte) Expression des Gens *CG6817* im Hintergrund der *kästchen* Mutationen in der Lage ist die Letalität der *kästchen* Mutationen zu retten. Des Weiteren haben diese Experimente gezeigt, dass die Deletion *kas*^{Δ33-4} nur *kästchen* als Letalfaktor betrifft.

3.3.8 Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen Kästchen/CG6817

Da alle bisherigen Ergebnisse zeigten, dass *kästchen* dem Gen *CG6817* entspricht, sollte die Topologie und Expression des Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers genauer charakterisiert werden. Auch die Auswirkungen der EMS-induzierten *kästchen* Mutationen auf die Protein-Topologie oder subzelluläre Verteilung können so geklärt werden. Zur Generierung des Antikörpers wurde ein spezifisches Peptid synthetisiert, das den Aminosäuren 80-95 im Bereich des N-Terminus des Proteins *CG6817* entspricht (Auswahl der Region in Zusammenarbeit mit der Firma Davids Biotechnologie, Regensburg). Diese Peptid wurde zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers (Kaninchen) eingesetzt (Davids Biotechnologie, Regensburg). Das affinitätsgereinigte Serum (IgG-Fraktion) wurde an *whole-mount* Wildtyp Embryonen und an Embryonen, die das Protein *CG6817* ektopisch exprimieren getestet.

Das ektopisch, im *en-GAL4* Muster exprimierte Protein läßt sich sehr gut nachweisen. Die gleichzeitige Färbung mit anti- α -Spectrin zeigt eine Kolo-kalisation der beiden Proteine entlang der Zellmembran (Abb. 40 A-C). In Wildtyp Embryonen ist das Protein in den meisten Zellen schwach nachweisbar. Innerhalb des ZNS kommt es zu einer Anreicherung des Proteins auf den Axonen der Konnektive und Kommissuren (Abb. 40 D). *Kästchen/CG6817* ist ein Transmembranprotein, das besonders stark von Neuronen innerhalb des ZNS exprimiert wird.

3.3.8 Kästchen ist ein evolutionär konserviertes Protein

Die Aminosäuresequenz des Kästchen Proteins wurde zur Vorhersage der Proteinstruktur und zur Identifizierung homologer Proteinen mit verschiedenen Softwareprogrammen analysiert (NCBI-Datenbanken, BDGP). Homologe Proteine finden sich in verschiedenen Spezies. So findet man Proteine mit mehr als 30% Sequenzidentität im Genom von *Anopheles Gambiae* (Stechmücke), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Mus musculus* (Maus) und des Menschen. Zur Übersichtlichkeit ist der direkte Sequenzvergleich nur mit den homologen Proteinen von *Anopheles Gambiae* und dem Menschen dargestellt (Abb. 41). Besonders

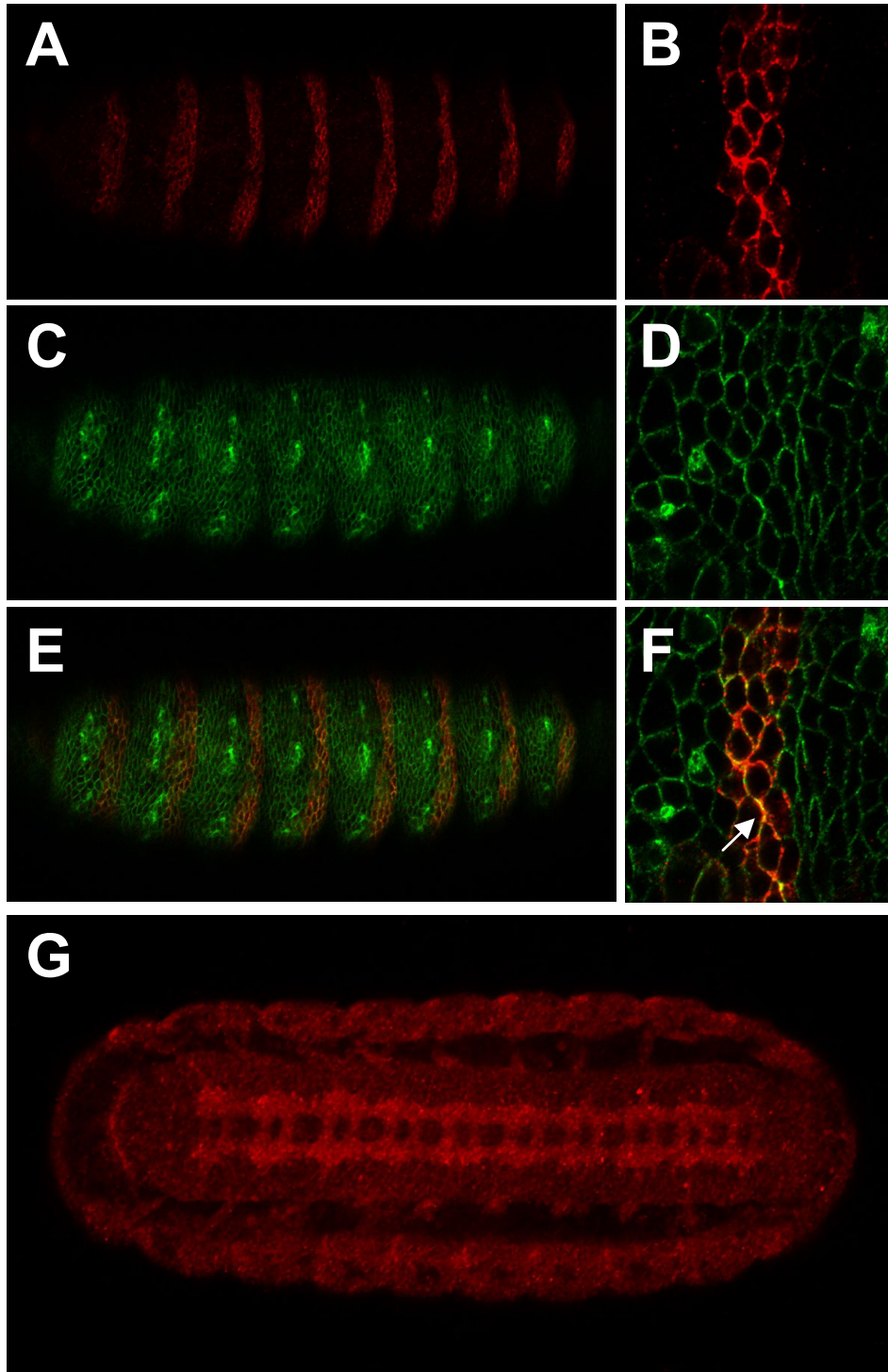


Abb. 40 Test des anti-CG6817/Kästchen Antikörpers. Nachweis des CG6817/Kästchen Proteins in *whole-mount* Embryonen, anterior ist links. (A-F) *en-GAL4/UAS-CG6817*; (G) Wildtyp. Die Spezifität des Antikörpers wurde an Embryonen getestet, die ektopisch *CG6817* exprimieren. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CG6817 erfolgte eine Markierung der Zellmembran mit dem mAb anti- α -Spectrin (grün). Es kommt zu einer Kolokalisation des ektopischen Proteins (rot) und α -Spectrin entlang der Zellmembran (F, Pfeil). Eine basale Expression des endogenen Proteins findet sich in allen Zellen. Eine erhöhte Expression ist in den Axonen des zentralen Nervensystems nachweisbar (G).

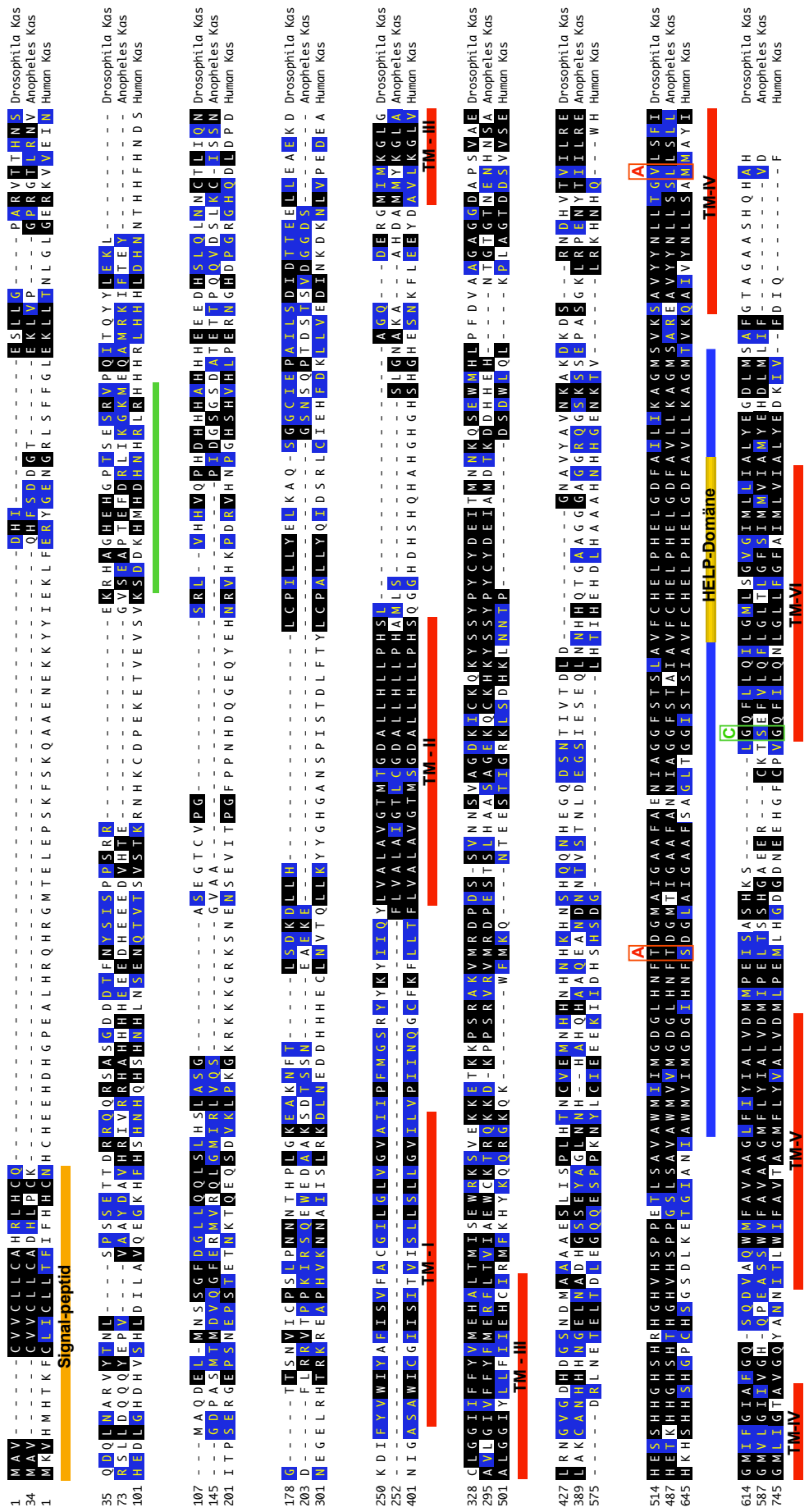


Abb. 41 Analyse des Kästchen Proteins. Dargestellt ist der Sequenzvergleich mit den beiden Proteinen, die die höchsten Homologien zu Kästchen zeigen. Die Sekundärstruktur von Kästchen wurde mit verschiedenen Programmen analysiert (Alignment der Sequenzen nach der Clustal-Methode, DNA-Star). Kästchen besitzt 6 putative Transmembrandomänen (TM-I bis TM-VI), die stark konserviert sind. Zusätzlich gibt es einen hoch konservierten Bereich (HELP-Domäne), der Sequenz-übereinstimmungen mit dem aktiven Zentrum von Metalloproteasen zeigt (HELP-Domäne). Eingezeichnet sind die Aminosäureaustausche, die aus den Basenaustauschen der *kästchen* Mutationen *kas^{B1-89}* (grün) und *kas^{P3-66}* (rot) resultieren. Alle Aminosäureaustausche betreffen stark konservierte Aminosäuren. Die Sequenz, die zur Generierung des anti-Kästchen Antikörpers verwendet wurde ist grün unterstrichen. Datenbank-Einträge: *Drosophila* Kästchen = FBan0006817 (Flybase); *Anopheles* Kas = gb|EAA11909.1 (*Anopheles* Genom Blast, NCBI); Humanes Kas = Hs12_9615_30_50_4 (vorhergesagtes Gen, NCBI).

Ergebnisse

auffällig hierbei sind die stark konservierten Bereiche im C-Terminus, hier findet man stellenweise identische Sequenzen über mehr als 15 Aminosäuren.

Die Analyse mit verschiedenen Softwareprogrammen zur Vorhersage der Sekundärstruktur zeigte, dass das Protein 6 putative Transmembrandomänen besitzt. Die Transmembran-Domänen sind interessanterweise mit die am stärksten konservierten Bereiche des Proteins. Die Datenbankanalysen zeigten zwei weitere Besonderheiten des Proteins. Die Region zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 ist sehr stark konserviert (Abb. 41, blau unterlegt) und in vielen Proteinen zahlreicher Spezies ähnlich strukturiert (ZIP-Domäne). Einige Proteine mit einer ZIP-Domäne fungieren als Zink²⁺-Transporter (MacDiarmid et al., 2000; Grotz et al., 1998). Innerhalb dieser Domäne findet sich ein HELP-Sequenzmotiv (Abb. 41, gelb unterlegt) (Suzuki and Endo, 2002). Dieser Sequenzabschnitt zeigt eine starke Homologie zu den aktiven Zentren verschiedener Metalloproteasen.

In den Vergleich der Proteinsequenzen sind die Positionen der bisher detektierten Aminosäure-Austausche in den *kästchen* EMS-Allelen *kas*^{B1-89} und *kas*^{D3-66} eingezeichnet (Abb. 41). Die Mutationen betreffen hoch konservierte Bereiche des Proteins und verändern möglicherweise die Topologie oder subzelluläre Lokalisation des Proteins.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass *kästchen/CG6817* für ein neues, in der Evolution stark konserviertes Protein kodiert. *kästchen* hat vielfältige Funktionen während der Embryogenese und ist möglicherweise an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden beteiligt. Besonders interessant ist die Funktion von *kästchen* bei der Kontrolle der Migration der Gliazellen im Embryo und im Auge.

3.4 Analyse des Gens *schmalspur*

Die Mutation *schmalspur* führt wie *klötzchen* und *kästchen* zu einem fusionierten Kommissurenphänotyps im embryonalen Nervensystem. Die Komplementationsgruppe setzt sich aus den drei EMS-induzierten Allelen *sur*^{D1-38}, *sur*^{D3-69} und *sur*^{D4-19} zusammen. Kreuzungen gegen Defizienzchromosomen und meiotischen Kartierungen gegen zwei P-Element Insertionen ermöglichten eine relativ genaue Kartierung von *schmalspur* in den Bereich 3L 62A08-62B01 (Pielage, 1999). Ausgehend von diesen Daten wurden weitere Experimente zur Klärung der molekularen Identität und Funktion von *schmalspur* für die Entwicklung des embryonalen Nervensystems durchgeführt.

3.4.1 Molekulare Charakterisierung von *schmalspur*

3.4.1.1 Meiotische Kartierung der *schmalspur* Letalität

Zur genaueren Eingrenzung des *schmalspur* Gens wurden meiotische Kartierungen gegen 5 P-Element Insertionen aus dem genomischen Bereich 62A-B durchgeführt. Die meiotische Distanz zwischen den P-Element Insertionen (w^+) und der Letalität des *schmalspur*-Locus wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

P-Element Insertion	Verhältnis $w^- : w^+$	Meiotischer Abstand zu <i>sur</i>
<i>EP(3)3673</i>	7 : 1329	~ 0,55 cM
<i>EP(3)3486</i>	6 : 1267	~ 0,5 cM
<i>EP(3)0304</i>	rauhe Augen in trans zu <i>sur</i>	n.a.
<i>EP(3)3143</i>	0 : 2433	< 0,1 cM
<i>EP(3)0522</i>	4 : 2075	~ 0,2 cM

Meiotische Kartierung von *schmalspur*. Die P-Elemente sind entsprechend ihrer Position von distal nach proximal auf dem Chromosom 3L angegeben. Die Rekombinationsereignisse konnten anhand der Augenfarbe festgestellt werden. Balancertiere wurden in die Analyse nicht mit einbezogen. cM: centi-Morgan. n.a.: nicht analysierbar (die P-Element Insertion führt nur zu einer sehr schwachen w^+ -Expression).

Die P-Elemente sind entsprechend ihrer Position auf dem Chromosom 3L von distal nach proximal angegeben. Hieraus ergibt sich, dass *schmalspur* ca. 0,5 cM distal und 0,2 cM proximal der P-Element Insertionen *EP(3)3486* bzw. *EP(3)0522* kartiert. Mit dem P-Element *EP(3)0304* konnte aufgrund der schwachen schwachen w^+ -Expression der Insertion keine meiotische Kartierung durchgeführt werden. Das P-Element zeigt aber eine direkte genetische Interaktion mit *schmalspur*. In Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allelen tritt ein leichter rauher Augenphänotyp auf (Abb. 43). Diese genetische Interaktion und die Nähe (ca. 30 kb) zu dem P-Element *EP(3)3143*, das genetisch nicht von der *schmalspur* Letalität getrennt werden konnte, legen nahe, dass *schmalspur* in die Umgebung des *EP(3)0304* kartiert.

3.4.1.2 Generierung von P-Element induzierten *schmalspur* Allelen

Zur molekularen Identifizierung von *schmalspur* wurde versucht P-Element induzierte *schmalspur* Allele zu generieren. Hierfür wurden die beiden P-Elemente *EP(3)3143* und *EP(3)0304* mit Hilfe des $\Delta 2-3$ -Transposase Stammes mobilisiert und neue P-Element Insertionen anhand einer Veränderung der Augenfarbe identifiziert. Jeweils ca. 400

Ergebnisse

Männchen mit veränderter Augenfarbe wurden auf Letalität in Transheterozygose zu *schmalspur* Mutationen getestet. Ausgehend von *EP(3)3143* konnten zwei Stämme isoliert werden, die embryonal letal in Transheterozygose zu *schmalspur* EMS-Allelen sind (*sur*³¹⁴³⁻¹, *sur*³¹⁴³⁻²) (siehe auch Tabelle 5). Für *EP(3)0304* konnten 15 Stämme isoliert werden, die entweder letal in Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allele sind oder aber eine starke genetische Interaktion mit EMS-induzierten *schmalspur* Allelen zeigen (*sur*³⁰⁴⁻¹ - *sur*³⁰⁴⁻¹⁵).

Die P-Element induzierten *schmalspur* Allele können 4 phänotypischen Klassen zugeordnet werden (Tabelle 5). Die hohe Anzahl der identifizierten *schmalspur* Allele ausgehend von der P-Element Insertion *EP(3)0304* legt nahe, dass nicht neue P-Element Insertionen, sondern unpräzise Exzisionen der Ausgangs-P-Element Insertion *EP(3)0304* für die Letalität bzw. genetische Interaktion mit *schmalspur* sind.

Zur genaueren Charakterisierung der P-Element induzierten *schmalspur* Allele wurden die Insertionsorte, die für die Veränderung der Augenfarbe und möglicherweise für die Interaktion mit *schmalspur* verantwortlich sind, durch eine Inverse-PCR Analyse charakterisiert. Gleichzeitig wurde getestet, ob die Ausgangs-P-Element Insertion *EP(3)0304* in den P-Element induzierten *schmalspur* Allelen noch vollständig vorliegt. Die Inverse-PCR wurde mit Hilfe der P-Element spezifischen Primer *Pry1* und *Pry2*, die in entgegengesetzter Orientierung Sequenzbereichen des 3' Inverted-Repeat des P-Elements entsprechen, durchgeführt. Die neuen P-Element Insertionen konnten nicht einheitlich einer Region zugeordnet werden und fanden sich häufig weit entfernt von dem Insertionsort der Ausgangslinie. Für die Überprüfung des Insertionsortes des *EP(3)0304* wurden jeweils ein spezifischer genomischer Primer und der P-Element Primer *Pry2* eingesetzt. Bei 4 der 15 Mutationen fehlte das 5' oder 3' Ende des P-Elements. Die Ergebnisse wurden durch eine Southern-Blot Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund korreliert gut mit der phänotypischen Stärke der P-Element induzierten *schmalspur* Allele, da dies die 4 stärksten Allele sind, die isoliert wurden (Tabelle 5). Bei allen anderen Allelen handelt es sich möglicherweise um P-Element interne Deletionen, die so Einfluß auf die Transkription des *schmalspur* Gens haben könnten.

3.4.1.3 Erzeugung von *schmalspur* „jump out“ Allelen

In einem weiteren Ansatz wurde versucht *schmalspur* Allele durch eine unpräzise Exzision des P-Elements *EP(3)0304* zu generieren. Zugleich sollte getestet werden ob die genetische Interaktion der P-Element Insertion mit *schmalspur* durch eine präzise Exzision

Ergebnisse

revertiert werden kann. Das P-Element wurde erneut mobilisiert und 150 *white* Chromosomen (d. h. Exzisionen des P-Elements) wurden auf Letalität in Transheterozygose zu *schmalspur* untersucht. Eine Vielzahl der Stämme zeigte keine genetische Interaktion mit den *schmalspur* EMS-Allelen. Der rauhe Augenphänotyp wird folglich spezifisch durch die Insertion des *EP(3)0304* verursacht. Zusätzlich konnten 5 weitere *schmalspur* Allele isoliert werden (*sur*^{304out1} – *sur*^{304out5}), die eine unterschiedlich starke genetische Interaktion mit den *schmalspur* EMS-Allelen zeigen.

Die molekulare Analyse der Allele per PCR und Southern-Blot ergab, dass bei 2 schwachen Allelen (*sur*^{304out1/2}) ein Großteil des 5'-Bereiches des P-Elements deletiert ist. Die flankierende genomische Sequenz ist nicht betroffen. Der verbleibende Rest der P-Element Insertion ist somit für die Letalität in Transheterozygose zu *schmalspur* verantwortlich. In diesem Ansatz wurde auch eine Deletion der *schmalspur* Region identifiziert. Bei dem Allel *sur*^{304out4} konnte eine komplette Exzision des P-Elements und der benachbarten genomischen Sequenz von ca. 5 kb beiderseits des Ausgangs-P-Elements durch eine Southern Blot Analyse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.1.3 Identifizierung der *schmalspur* cDNA

Zur molekularen Identifizierung von *schmalspur* wurde die flankierende Region des P-Elements *EP(3)0304* auf mögliche kodierende Sequenzen untersucht. Datenbankanalysen zeigten, dass das BDGP cDNA Klon identifiziert hat (5' ESTs), die in den Bereich des Insertionsortes des P-Elements kartieren. Die entsprechenden cDNA-Klone wurden bestellt (Invitrogen) und die terminalen Sequenzen bestimmt (5' und 3'). Der größte cDNA Klon, *GH11843* wurde vollständig sequenziert und die cDNA Sequenz mit der genomischen Sequenz verglichen. Die cDNA ist 1166 bp lang und besitzt keine Introns. Innerhalb der cDNA Sequenz gibt es einen durchgehenden offenen Leseraster, der für ein Protein von 245 Aminosäuren kodiert. In den Datenbanken des BDGP wird das Gen als *CG13928* bezeichnet. Das P-Element *EP(3)0304* ist innerhalb des 5' UTR des Gens *CG13928* inseriert (Abb. 42). Die Insertion in den 5' UTR Bereich zusammen mit der molekularen Analyse der P-Element induzierten *schmalspur* Allele deutet darauf hin, dass *schmalspur* dem Gen *CG13928* entspricht.

Allerdings befindet sich das komplette Gen *CG13928* innerhalb des ersten Introns eines Gens, das für eine γ -Glutamyl-Carboxylase (*CG*) kodiert (Li et al., 2000; Walker et al., 2001)(Abb. 42). *schmalspur* kann aber nicht diesem Gen entsprechen, da durch eine

1 kb

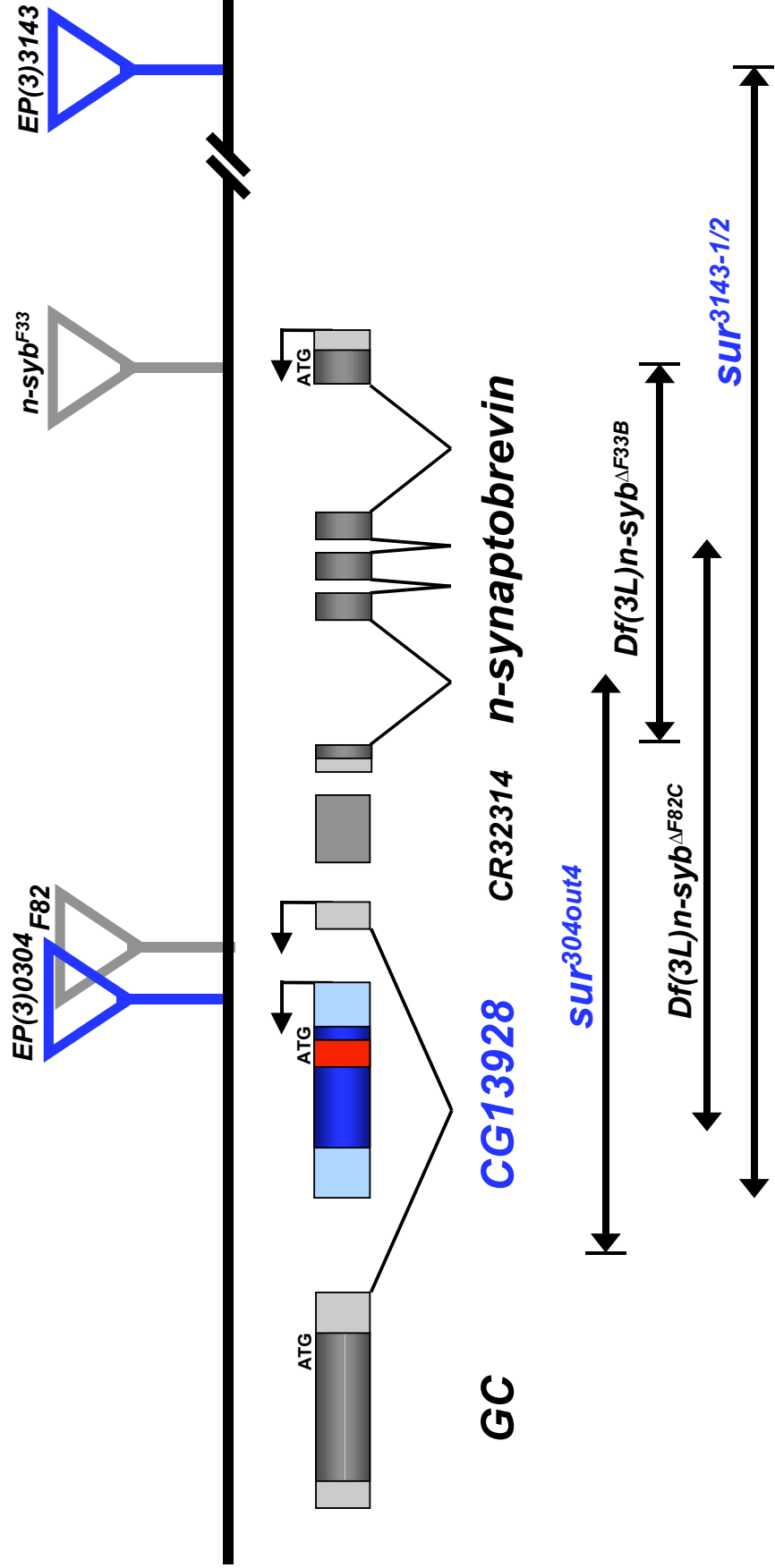


Abbildung 42 Die *schmalspur* Region. Dargestellt sind alle vorhergesagten Gene des BDGP und die verwendeten P-Element Insertionen. Die beiden blau eingezeichneten P-Elemente EP(3)0304 und EP(3)3143 wurden zur Erzeugung von P-Element induzierten Allelen/Deletionen verwendet. Die Bruchpunkte der Deletionen sind durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet. Alle genetischen Daten deuten darauf hin, dass *schmalspur* durch das Gen CG13928 kodiert wird, das innerhalb des Introns von CG13928 entspricht der konservierten Domäne des Proteins, einem PHD-Finger. Angaben der Bruchpunkte und Insertionsorte der *n-syb* Allele (Deitcher et al., 1998). Bei CR32314 handelt es sich um eine nicht-kodierende RNA (BDGP-Information).

Ergebnisse

gerichtete Mutagenese gezeigt werden konnte, dass das Gen *CG* nicht essentiell für die Entwicklung von *Drosophila* ist (Rong et al., 2002).

Nur 3 kb proximal von *CG13928* kartiert das genetisch detailliert charakterisierte Gen *neuronal-synaptobrevin (n-syb)* (Deitcher, 1998) (Abb. 42). Um auszuschließen, dass *schmalspur n-syb* entspricht, wurden einige *n-syb* Mutationen auf Komplementation von *schmalspur* getestet. Es wurden drei unterschiedliche *n-syb* Allele verwendet. Die P-Element Insertion *n-syb^{F33}* und die kleine Deletion *n-syb^{ΔF33B}* betreffen ausschließlich die genomische Region von *n-syb*. Eine weitere Deletion von *n-syb* (*n-syb^{ΔF82C}*) wurde ausgehend von einem vitalen P-Element (*F82*) induziert, das in unmittelbarer Nähe des Gens *CG13928* kartiert (Deitcher et al, 1998). Die Bruchpunkte dieser Deletion (*n-syb^{ΔF82C}*) sind nicht bekannt (Abb. 42). Die *schmalspur* EMS-Allele komplementieren die beiden *n-syb* spezifische Allele, nicht aber die Defizienz *n-syb^{ΔF82C}*. *schmalspur* entspricht somit nicht *n-syb*, wird aber durch die molekular nicht charakterisierte Defizienz *n-syb^{ΔF82C}* aufgedeckt.

Komplizierter ist die Situation bei den P-Element induzierten *schmalspur* Allelen. Nahezu alle Allele komplementieren die *n-syb*-interne Deletion *n-syb^{ΔF33B}* nicht (Tabelle 5). Die transheterozygoten Tiere sterben allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt als transheterozygote Tiere mit den Deletionen *sur^{304out4}* oder *n-syb^{ΔF82C}*. Warum auch die P-Element internen Deletionen des *EP(3)0304* die Deletion *n-syb^{ΔF33B}* nicht komplementieren, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise befinden sich regulatorische Sequenzen von *n-syb* im Bereich des Gens *CG13928*.

Die genetischen Interaktionen zwischen den EMS- bzw. P-Element induzierten *schmalspur* Allelen und den *n-syb* Allelen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die genetische Analyse zeigt deutlich die 4 phänotypischen Klassen der *schmalspur* Allele. Die *schmalspur* EMS-Allele, die Deletionen der *schmalspur* Region *sur^{304out4}*, *sur^{3143-1/2}* und 5 weitere Exzisions-Mutanten führen zu embryonaler bzw. früh larvaler Letalität in Homozygose und in Transheterozygose zu den Defizienzen. 4 Allele des ersten „local hop“ Ansatzes führen zur Letalität im ersten Larvalstadium in Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allelen. Interessanterweise verbleiben die mutanten Larven nicht im Futter, sondern wandern an der Wand des Aufzuchttröhrchens hoch und sterben dort. In dieser Klasse befindet sich auch eines der wenigen Allele (*sur³⁰⁴⁻⁶*), das nicht letal in Transheterozygose zu *n-syb^{Δ33B}* ist.

Ergebnisse

Tabelle 5

	<i>sur</i> ^{EMS}	<i>EP(3)0304</i>	<i>sur</i> ^{304out4}	<i>sur</i> ^{304out5}	<i>n-syb</i> ^{Δ33B}	<i>PCR</i> ^{<i>EP(3)0304</i>}
<i>sur</i> ^{EMS}	letal	rauhe Augen	letal	letal	vital	-
<i>EP(3)0304</i>	rauhe Augen	vital	letal	-	vital ↓	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹	letal	pupal E↓	letal	pupal E↓	letal	kein 5 ^c
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻²	letal	pupal E↓	letal	pupal E↓ ^(50%)	pupal E	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻³	letal L1↑	pupal	letal	pupal E↓ ^(50%)	letal	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻⁴	pupal	pupal E↓	letal	pupal E↓ ^(75%)	pupal	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻⁵	letal L1↑	pupal	letal	pupal E↓ ^(50%)	letal	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻⁶	letal L1↑	pupal E↓	letal	pupal E↓ ^(50%)	vital	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻⁷	pupal	-	letal	-	pupal E ^(10%)	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻⁸	pupal	pupal E↓	letal	pupal E↓ ^(20%)	pupal	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻⁹	letal	pupal	letal	pupal E↓ ^(5%)	letal	kein 3 ^c
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹⁰	letal	pupal E↓	letal	pupal E↓ ^(10%)	letal	kein 5 ^c
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹¹	rauhe Augen ⁺⁺	-	-	pupal E↓	vital	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹²	rauhe Augen ⁺⁺	-	pupal	-	pupal	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹³	rauhe Augen ⁺	pupal E↓	pupal	pupal E	pupal E	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹⁴	letal L1↑	-	letal	-	pupal	+
<i>sur</i> ³⁰⁴⁻¹⁵	letal	pupal	letal	pupal	letal	kein 5 ^c
<i>sur</i> ³¹⁴³⁻¹	letal	pupal E↓ ^(5%)	letal	pupal	letal	-
<i>sur</i> ³¹⁴³⁻²	letal	pupal	letal	pupal	letal	-
<i>sur</i> ^{304out1}	pupal	pupal E↓	pupal	-	vital ↓	kein 5 ^c
<i>sur</i> ^{304out2}	pupal	pupal E↓	pupal L	-	vital ↓	kein 5 ^c
<i>sur</i> ^{304out3}	letal	-	-	-	-	+
<i>sur</i> ^{304out4}	letal	pupal	letal	pupal	letal	kein 3 ^c & 5 ^c
<i>sur</i> ^{304out5}	pupal	-	letal	pupal	-	+

Komplementationsanalyse der P-Element induzierten *schmalspur* Allele. Die interessantesten Stämme sind durch Grauschattierung hervorgehoben. Stämme, denen das 3^c oder 5^c Ende der P-Insertion *EP(3)0304* fehlt, zeigen meist einen starken Phänotyp. Ausnahme sind die beiden später generierten Stämme *sur*^{304out1/2}, denen nur P-Element Sequenz, nicht aber benachbarte genomische Sequenz fehlt. Bei dem phänotypisch stärkste Allel *sur*^{304out4} konnte eine Deletion der *schmalspur* Region nachgewiesen werden. Die Stämme zeigen eine unterschiedlich starke genetische Interaktion mit *n-syb* Allelen. Hier ist das Allel *sur*³⁰⁴⁻⁶ besonders auffällig, das die *n-syb* Allele komplementiert aber eine starke Interaktion mit *schmalspur* zeigt (dunkelgrau unterlegt).

letal: embryonal oder früh larval letal. **letal L1↑:** L1 Larven verlassen das Futter und sterben am Rand des Aufzuchttröhrchens. **pupal:** die Tiere sterben als Puppe. **pupal E↓:** die meisten Tiere sterben als Puppe, einige wenige Fliegen schlüpfen, sind aber so schwach, dass sie sofort in das Futter fallen und sterben. **pupal E↓^(10%):** die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil Escaper zu Tieren, die in der Puppe sterben. **vital ↓:** die Tiere sind lebensfähig aber sehr schwach und fallen häufig ins Futter und sterben dort. -: nicht analysiert.

Ergebnisse

Eine weitere Klasse ist pupal letal in Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allelen. Die letzte phänotypische Gruppe ist beschränkt lebensfähig in Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allelen; hier kommt es jedoch zu einer Beeinträchtigung der Augenentwicklung. Die *schmalspur* EMS-Allele sind keine Null-Allele, da die phänotypische Stärke der genetischen Interaktionen bei Verwendung der *schmalspur* Defizienz *sur*^{304out4} deutlich stärker ist. *sur*³⁰⁴⁻¹² ist letal in Transheterozygose zu der Defizienz nicht aber in Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allelen.

Die Funktion von *schmalspur* für die Augenentwicklung wurde mit Hilfe des P-Elements *EP(3)0304* und den beiden augenspezifischen Allelen *sur*³⁰⁴⁻¹¹ und *sur*³⁰⁴⁻¹² analysiert. Es wurden zwei unterschiedliche *schmalspur* EMS-Allelen verwendet. Bei dem Allel *sur*^{D1-38} befindet sich ein *white*⁺ Chromosom im Hintergrund, so dass die Tiere eine rote Augenfarbe zeigen. In Transheterozygose zu dem P-Element *EP(3)0304* kommt es zu einer leichten Beeinträchtigung der Augenentwicklung. Die regelmäßige Anordnung der Ommatidien des Komplexauges ist gestört (Abb. 43 B, C). Der Phänotyp wird verstärkt, wenn das Allel *sur*³⁰⁴⁻¹¹ verwendet wird. Neben der Unregelmäßigkeit der Ommatidien kommt es zu einer Reduktion der Größe der Augen, besonders in der anterior-mediane Region (Abb. 43 D, G). Zu einer noch stärkeren Reduktion der Augengröße kommt es in Transheterozygose der EMS-Allele zu dem Allel *sur*³⁰⁴⁻¹² (Abb. 43 E, F, H, I).

Die Augenphänotypen sind relativ variabel. So findet man in der Kreuzung gegen das *EP(3)0304* auch vereinzelt wildtypische Augen und die extreme Reduktionen des Augenfeldes sind nur selten zu finden. Interessanterweise findet man in *sur*^{304out4}/*sur*³⁰⁴⁻¹² Puppen keine Beeinträchtigung der Augenentwicklung.

3.4.2 Phänotypische Charakterisierung von *schmalspur*

3.4.2.1 Analyse des fusionierten Kommissurenphänotyps

Die Mutation *schmalspur* führt zu einem charakteristischen ZNS Phänotyp, der sich qualitativ von *klötzchen* und *kästchen* unterscheidet. In *schmalspur* mutanten Embryonen sind die anteriore und posteriore Kommissur in den meisten Segmenten noch voneinander getrennt. Das ZNS ist aber deutlich schmaler als im Wildtyp (daher der Name), so dass durch die Nähe der Konnektive zueinander die Kommissuren leicht fusioniert erscheinen (Abb. 44 B-D). *schmalspur* mutante Embryonen zeigen einen leichten Keimstreifrückzugs-Defekt und das ZNS scheint in der Mitte der Abdominalsegmente leicht zu „knicken“. Zugleich kommt es

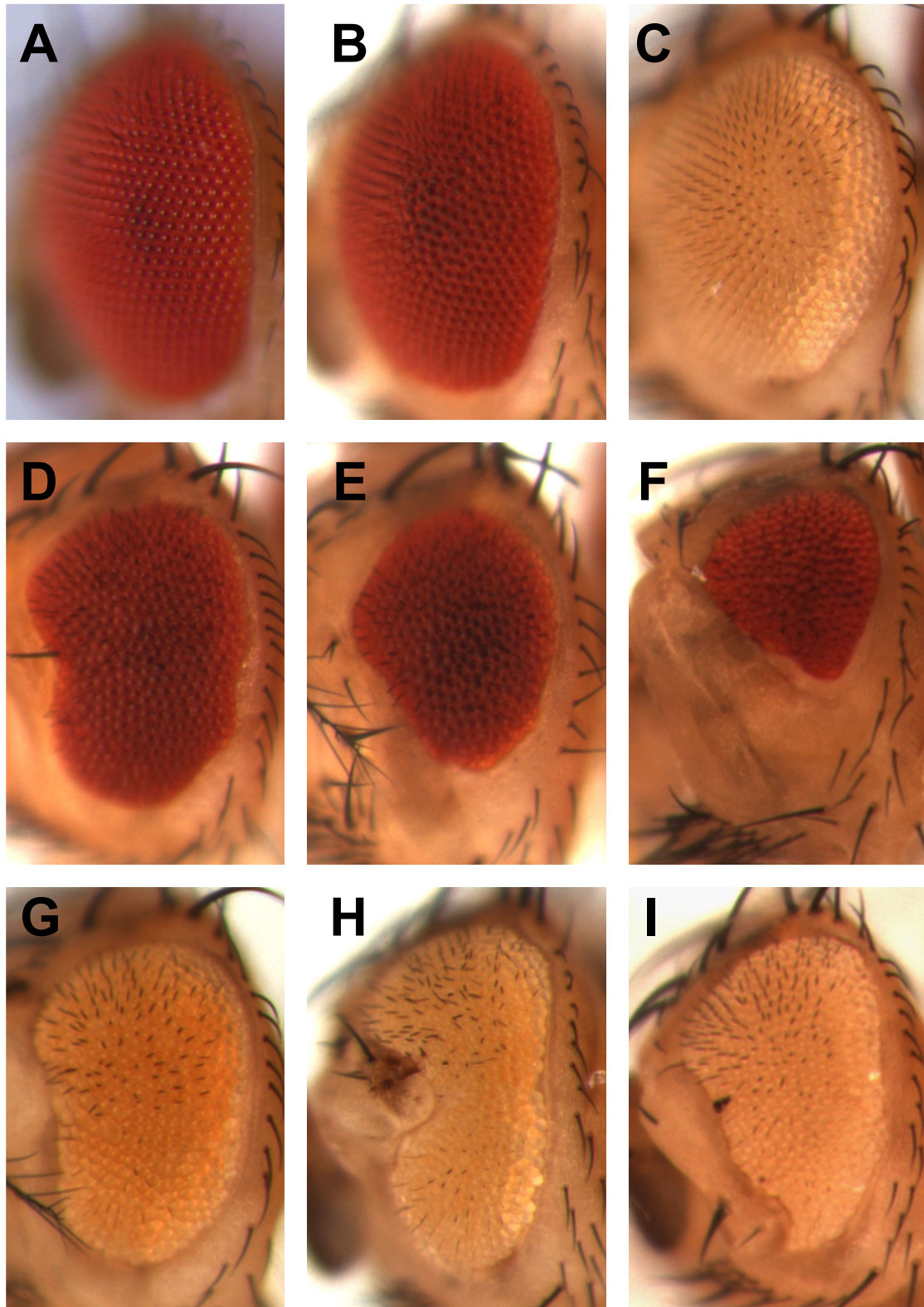


Abb. 43 Analyse der Augenfunktion von *schmalspur*. Dargestellt sind laterale Ansichten der Komplexaugen, anterior ist links. (A) Wildtyp; (B) *sur^{D1-38}/EP(3)0304*; (C) *sur^{D4-19}/EP(3)0304*; (D) *sur^{D1-38}/sur³⁰⁴⁻¹¹*; (E, F) *sur^{D1-38}/sur³⁰⁴⁻¹²*; (G) *sur^{D4-19}/sur³⁰⁴⁻¹¹*; (H, I) *sur^{D4-19}/sur³⁰⁴⁻¹²*. Die *schmalspur* EMS-Allele zeigen eine genetische Interaktion mit dem *EP(3)0304*; es kommt zu einem rauhen Augenphänotyp. Dieser Phänotyp ist deutlich stärker ausgeprägt in Transheterozygose zu den *schmalspur* Allelen *sur³⁰⁴⁻¹¹* und *sur³⁰⁴⁻¹²*. Die Anordnung der Ommatidien ist gestört und es kommt zu einer deutlichen Reduktion der Augengröße (D-I).

Ergebnisse

in *schmalspur* mutanten Embryonen zu einem starken Darmdefekt, die Konstriktionen des Mitteldarms sind unvollständig, so dass der Darm auf das Nervensystem „drückt“ und den ZNS-Phänotyp verstärkt. Die deutlichste Fusion der Kommissuren ist in den mittleren Abdominalsegmenten zu erkennen, dem Bereich, der am stärksten durch den Darmdefekt beeinflusst wird. Diese indirekten Verstärkungseffekte führen zu einer relativ großen Variabilität der *schmalspur* Phänotypen. In allen Abbildungen wurden repräsentative Phänotypen dargestellt, die die unterschiedlichen qualitativen Aspekte des *schmalspur* Phänotyps zeigen.

Die phänotypische Varianz ist bei der Darstellung des ZNS Phänotyps mit dem mAb BP102 gut zu erkennen. In homozygot mutante Embryonen des schwachen *schmalspur* EMS-Allels *sur*^{D3-69} sind die Kommissuren voneinander getrennt, die Konnektive liegen jedoch dichter beieinander und das ZNS beschreibt einen leichten Bogen („Knick“) (Abb. 44 C). *sur*^{D4-19} mutante Embryonen zeigen eine stärkere Fusion der Kommissuren, die bei *sur*^{D1-38} mutanten Embryonen noch deutlicher ausgeprägt ist (Abb. 44 B, D). Die Konnektive befinden sich in beiden Fällen näher an der Mittellinie als im Wildtyp (Abb. 44 A, D).

Zur Definition der *schmalspur* Null-Phänotyps wurde die kleine Deletion *sur*^{304out4} analysiert. Homozygote *sur*^{304out4} Embryonen zeigen einen qualitativ stärkeren Phänotyp als die *schmalspur* EMS-Allele. Es kommt zu einer vollständigen Fusion der Kommissuren in allen Segmenten und die Konnektive sind kaum noch vorhanden (Abb. 44 F). In Transheterozygose zu *sur*^{D4-19} wird dieser Phänotyp leicht abgeschwächt, ist aber stärker als der Phänotyp homozygoter *sur*^{D4-19} Embryonen (Abb. 44 D-F). Die *schmalspur* EMS-Allele sind nur hypomorphe *schmalspur* Mutationen.

Es ist nicht wahrscheinlich, dass der Verlust von *n-syb* oder *CG* in *sur*^{304out4} zu dem ZNS-Phänotyp beiträgt, da der komplette Verlust von *n-syb* oder *CG* keinen Einfluß auf die Entwicklung des Nervensystems hat (Deitcher et al., 1998; Rong et al., 2002).

Der *schmalspur* ZNS Phänotyp wird sehr viel deutlicher bei der Analyse der mutanten Embryonen mit dem mAb anti-Fasciclin II. Im Wildtyp markiert der Antikörper drei longitudinale Faszikel innerhalb der Konnektive (Abb. 45 A). Der Abstand der einzelnen Axonbündel und besonders der Abstand der beiden medianen Axonfasern beiderseits der Mittellinie zueinander, kann so sehr viel besser beurteilt werden und ermöglicht eine qualitativ genauere Beschreibung des *schmalspur* Phänotyps (Abb. 45). Schon bei dem schwachen *schmalspur* Allel *sur*^{D3-69} kommt es zu einer Verengung des Abstandes zwischen

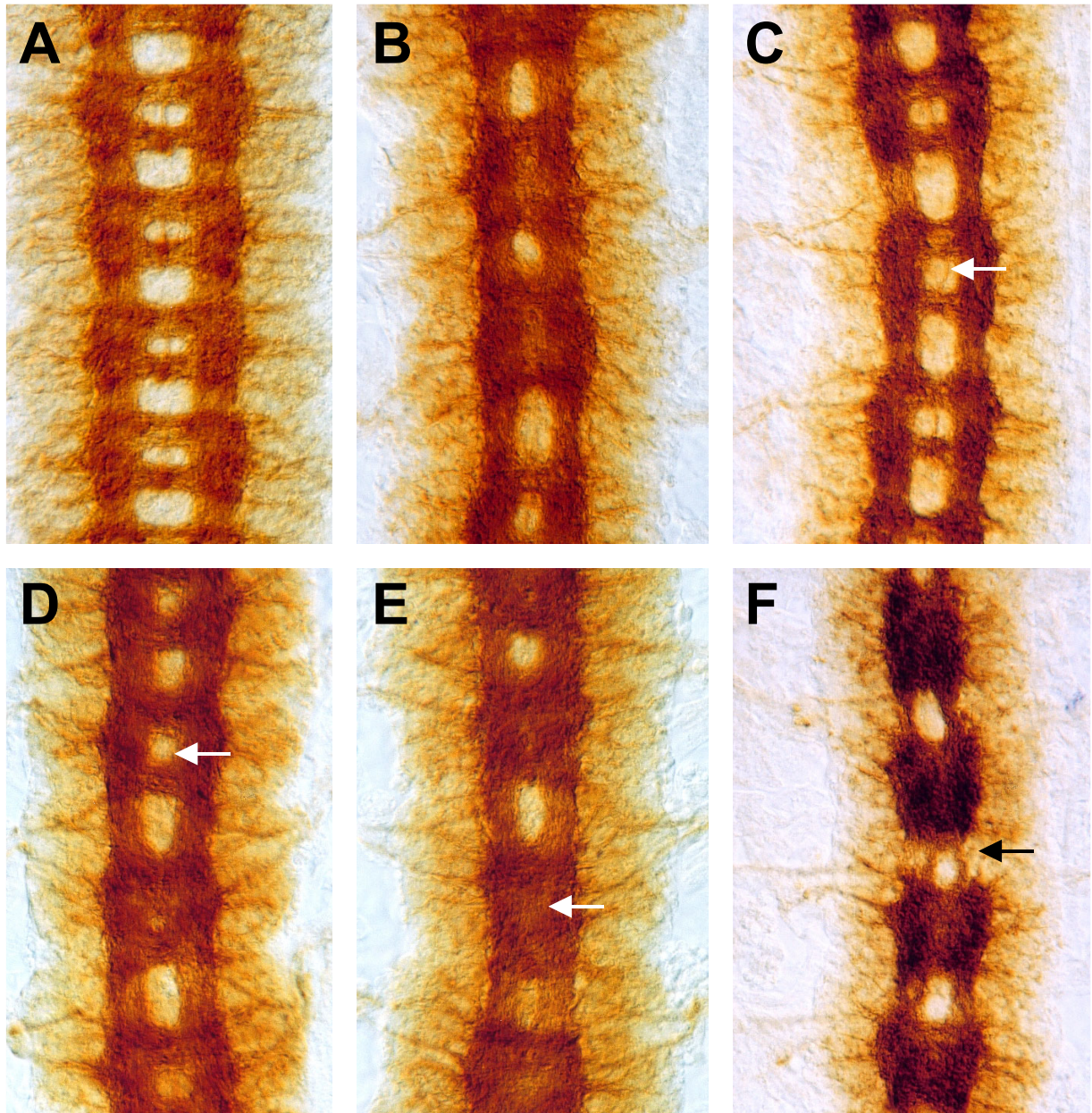


Abb. 44 Der *schmalspur* ZNS-Phänotyp. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. (A) Wildtyp; (B) *sur^{D1-38}*; (C) *sur^{D3-69}*; (D) *sur^{D4-19}*; (E) *sur^{D4-19}/sur^{304-out4}*; (E) *sur^{304-out4}*. In *schmalspur* mutanten Embryonen liegen die Konnektive deutlich näher beieinander als im Wildtyp. Während in *sur^{D3-69}* Mutanten die Kommissuren noch voneinander getrennt sind (C, Pfeil), so kommt es bei *sur^{D4-19}* und besonders bei *sur^{D1-38}* zu einer Fusion der Kommissuren (B). Homozygot mutante Embryonen der *schmalspur* Deletion *sur^{304-out4}* führen zu einem deutlich stärkeren Phänotyp. Es kommt zu einer vollständigen Fusion der Kommissuren in allen Segmenten und die Konnektive sind kaum noch vorhanden (F, Pfeil). Der Phänotyp transheterozygoter Embryonen von *sur^{D4-19}* und *sur^{304-out4}* ist stärker als der Phänotyp homozygoter *sur^{D4-19}* Embryonen. Die *schmalspur* EMS-induzierten Mutationen sind folglich hypomorphe *schmalspur* Allele.

Ergebnisse

den beiden medianen Axonbündeln und stellenweise zu einem direkten Kontakt zwischen den Konnektiven (nicht in allen Embryonen) (Abb. 45 C). Der gleiche Phänotyp findet sich auch in mutanten Embryonen der beiden stärkeren Allele; hier treten allerdings auch Embryonen mit stärkeren Ausprägungen des Phänotyps auf (Abb. 45 B, D). So wird letztendlich der Abstand zwischen den Konnektiven immer geringer und die Anzahl der medianen Kontaktstellen auf Höhe der Mittellinie nimmt zu. Die stärkste Ausprägung findet man wiederum bei Embryonen, die homozygot mutant für die Deletion *sur*^{304out4} sind (Abb. 45 F). Hier ist das äußere Faszikel nahezu vollständig abwesend und die medianen Faszikel stehen über länger Bereiche in direktem Kontakt miteinander. Dieser Kontakt ist hauptsächlich im Bereich der Kommissuren zu beobachten. Der transheterozygote Phänotyp von *sur*^{D4-19} über *sur*^{304out4} entspricht dem Mittelwert beider Einzelphänotypen (Abb. 45 E).

Von besonderer Bedeutung ist, dass der beobachtete Phänotyp nur in der Stärke, nicht aber qualitativ variiert. Folglich stellt der Phänotyp der Deletion wahrscheinlich den amorphen *schmalspur* Phänotyp dar. Obgleich es zu einem direkten Kontakt der Faszikel entlang der Mittellinie kommt, ist kein Kreuzen von Axonen über die Mittellinie zu beobachten.

Die Verteilung der lateralen Gliazellen wurde mit dem anti-Repo Antikörper untersucht. Im Wildtyp ist beim Vergleich mit der anti-Fasciclin II Färbung gut zu erkennen, dass die lateralen Gliazellen beiderseits der Mittellinie gleichmäßig entlang der Konnektive verteilt sind und nur im Bereich der Kommissuren aufeinandertreffen (Abb. 45 G). In *schmalspur* mutanten Embryonen verhalten sich die longitudinalen Gliazellen analog zu den Faszikeln der Konnektive. Alle Gliazellen befinden sich näher an der Mittellinie und die gleichmäßige Anordnung der Zellen geht besonders im Bereich der Kommissuren verloren (Abb. 45 H, I). Zugleich scheinen weniger Gliazellen im lateralen Neuropil, dem Bereich zwischen den Konnektiven und dem Übergang zum peripheren Nervensystem, vorhanden zu sein. Dieser Phänotyp wird besonders deutlich in *sur*^{D4-19} mutanten Embryonen (Abb. 45 I). Die Zellkerne der Gliazellen erscheinen in *schmalspur* mutanten Embryonen deutlich kleiner als im Wildtyp. Gleichzeitig war der immunhistochemische Nachweis des Repo-Antigens bei den mutanten Embryonen schwächer als bei heterozygoten Embryonen der gleichen Färbung. Ob diese Effekte auf eine allgemeine Reduktion der Zellgröße zurückzuführen sind, wurde nicht näher bestimmt.

Die Analyse des *schmalspur* ZNS-Phänotyps zeigt, dass der fusionierte Kommissurenphänotyp anders entsteht als bei *klötzchen*, *kästchen* oder weiteren Mitgliedern

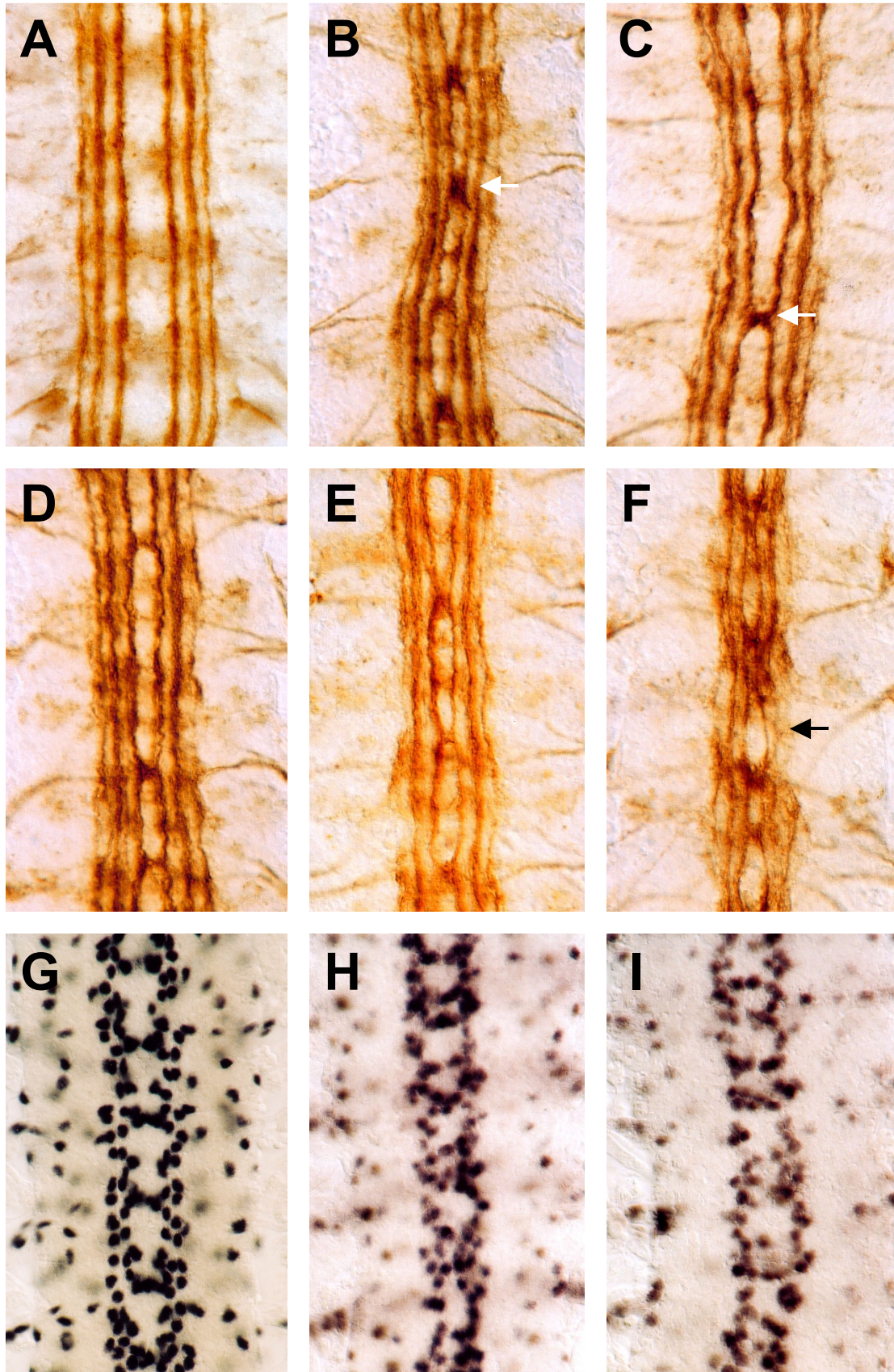


Abb. 45 Analyse der lateralen Axone und Gliazellen in *schmalspur* Mutanten. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Die lateralen Axone wurden mit dem mAb anti-Fasciclin II (1D4) (A-F) und die lateralen Gliazellen mit dem mAb anti-Repo (G-I) analysiert. (A, G), Wildtyp; (B, H) *sur*^{D1-38}; (C) *sur*^{D3-69}; (D, I) *sur*^{D4-19}; (E) *sur*^{D4-19}/*sur*^{304-out4}; (F) *sur*^{304-out4}. In *schmalspur* mutanten Embryonen kommt es zu einem Kontakt der medianen Fasciclin II-positiven Axone an der ventralen Mittellinie (B-F). Die Zellkerne der lateralen Gliazellen sind kleiner als im Wildtyp und befinden sich näher an der Mittellinie (G-I).

Ergebnisse

der *pointed* Gruppe (Hummel et al., 1999). Es kommt nicht primär zu einer Störung der Migration der ML-Gliazellen, sondern zu einer Reduktion des Abstandes zwischen den Konnektiven.

3.4.2.2 Analyse der Funktion von *schmalspur* für die Muskulatur und Motoneurone

Der Darmdefekt *schmalspur* mutanter Embryonen deutet auf eine Funktion von *schmalspur* bei der Ausbildung der Muskulatur. In die Analyse der somatischen Muskulatur wurde die Analyse der Projektion der Motoneurone mit einbezogen. Das generelle Muster der somatischen Muskulatur ist in *schmalspur* mutanten Embryonen nahezu unverändert. Ein geringer Anteil der mutanten Embryonen zeigt jedoch leichte Defekte, so sind einzelne Muskeln nicht richtig positioniert und es kommt zu falschen Kontakten zwischen Muskelgruppen (Abb. 46 E). Es fällt allerdings auf, dass die einzelnen Muskelbändern weiter voneinander entfernt sind als im Wildtyp (Abb. 46 E, Abb. 47 D). Bei der Projektion der Motoneurone kommt es zu deutlicheren Defekten. In fast allen Embryonen ist eine Fehlprojektionen einzelner Axone über Segmentgrenzen hinweg zu beobachten (Abb. 46 D, F).

Der Muskelphänotyp wurde in einem zweiten Ansatz mit der Enhancer Trap Linie *MHC-lacZ* und gleichzeitiger Färbung des ZNS mit dem Antikörper BP102 analysiert. Hierbei war von besonderem Interesse, ob die Ansatzstellen der ventralen Muskeln ebenso zur Mittellinie verschoben sind wie die Axone und Gliazellen innerhalb der zentralen Nervensystems. Im Wildtyp befinden sich die ventralen Muskelansatzstellen an der lateralen Grenze des ZNS (Abb. 47 A). In *schmalspur* mutanten Embryonen (*sur^{D4-19}/sur^{304out4}*) ist die Reduktion der Breite des ZNS gut zu erkennen (Abb. 47 C, es wurde auf die Muskelzellen fokussiert, so daß die Axone unscharf wirken). Die Muskelzellen respektieren die virtuelle Grenze des ZNS nicht mehr, die Muskelansatzstellen befinden sich nah an der ventralen Mittellinie. Vereinzelt kommt es zum Kontakt der Muskelfasern gegenüberliegender Hemisegmente auf Höhe der ventralen Mittellinie. Wiederum wird die Mittellinie ventral des ZNS aber nicht überschritten. Die Ausschnittsvergrößerung der lateralen somatischen Muskulatur verdeutlicht noch einmal den *schmalspur* Muskel-Phänotyp (Abb. 47 D).

Die Analyse der embryonalen Phänotypen von *schmalspur* zeigte zwei wesentliche qualitative Aspekte. Erstens, es kommt es zu einer Verschiebung unterschiedlicher Zelltypen zur ventralen Mittellinie. Dieser Phänotyp ist bei den Axonen der Konnektive, den mit den Konnektiven assoziierten Gliazellen und den Zellen der somatischen Muskulatur zu

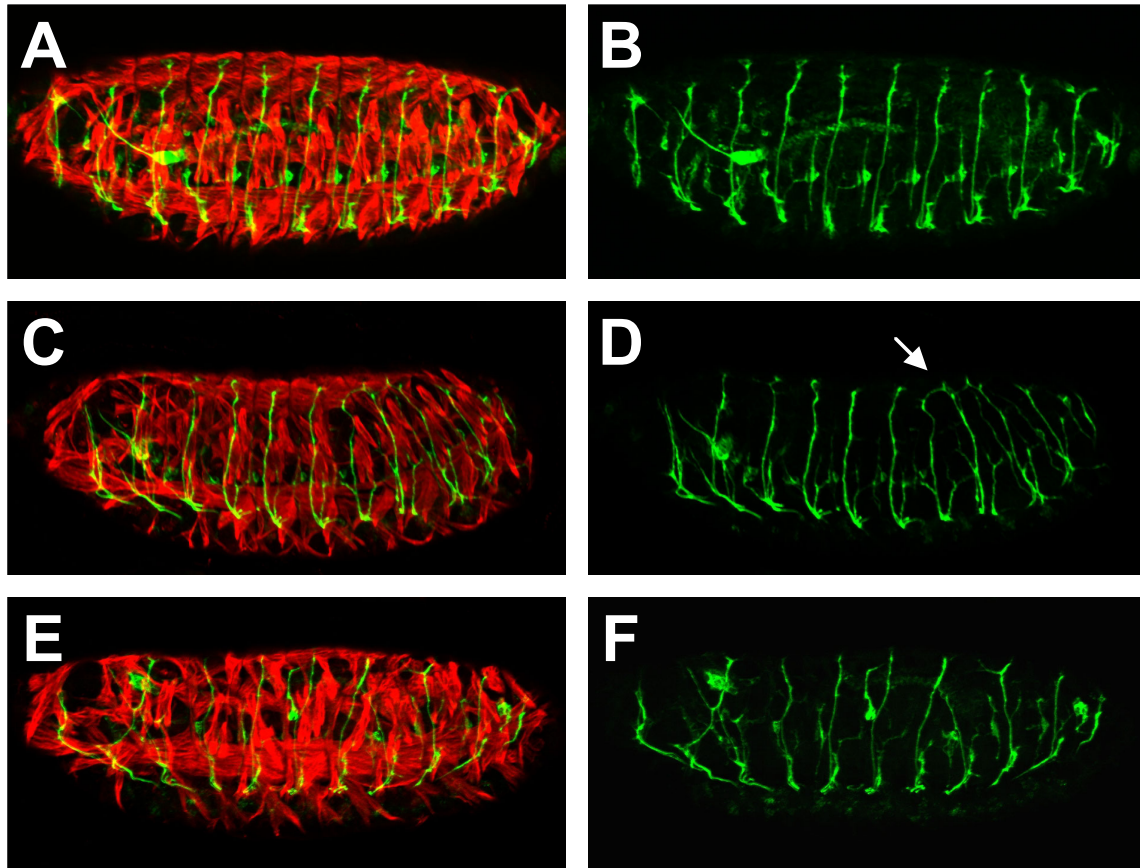


Abb. 46 Muskel- und Motoneuron-Defekte in *schmalspur* mutanten Embryonen. Laterale Ansicht von *whole-mount* Embryonen des Stadiums 16. Die somatische Muskulatur wurde mit dem mAb anti- β -Tubulin (rot) und die Projektion der Motoneurone mit dem mAb 1D4 analysiert (grün). (A, B) Wildtyp; (C, D) *sur*^{D1-38}; (E, F) *kas*^{D4-19}.

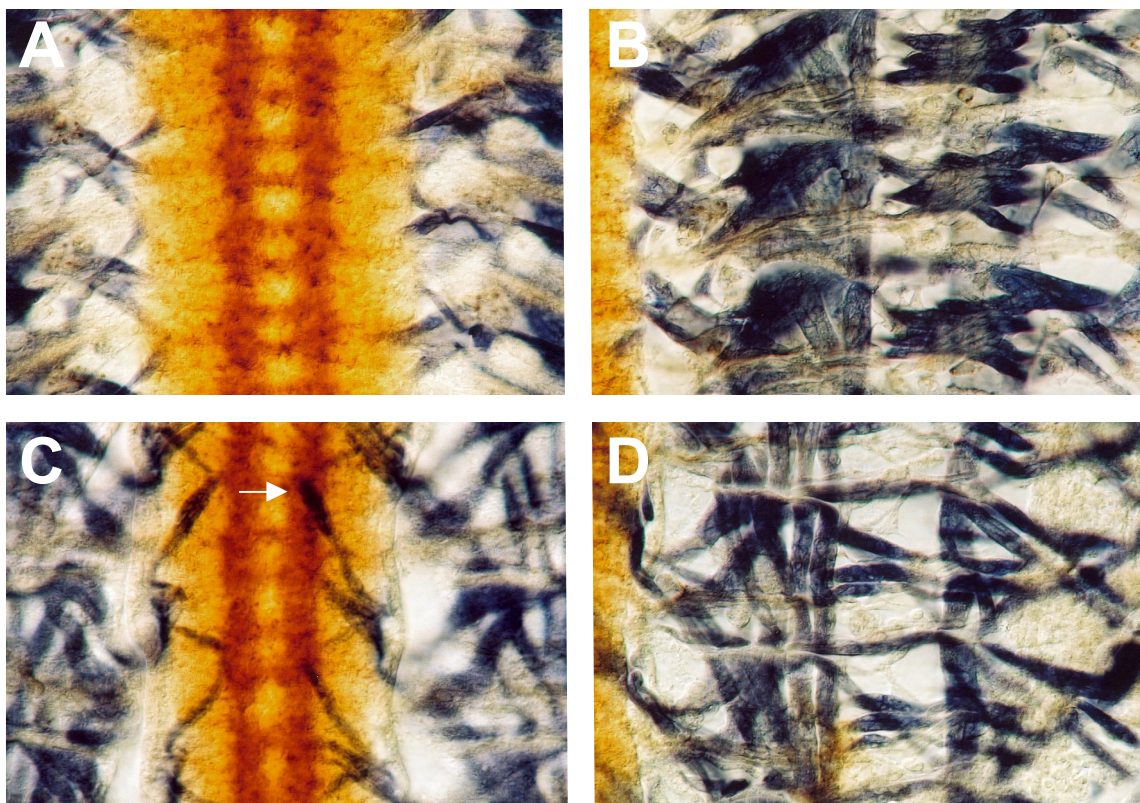


Abb. 47 Muskeldefekte in *schmalspur* mutanten Embryonen II. Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. (A, B) Wildtyp; (C, D) *sur*^{D4-19}/*sur*^{304out4}. In *schmalspur* mutanten Embryonen sind die Muskelansatzstellen zur Mittellinie verschoben (C, Pfeil).

Ergebnisse

beobachten. Allerdings respektieren alle Zellen die Mittellinie als Grenze des Hemisegments. Zweitens, viele Zelltypen wirken kleiner im Vergleich zu den Wildtyp Zellen.

3.4.3 Analyse der mRNA-Expression von *schmalspur/CG13928*

Die Analyse der embryonalen Phänotypen zeigte eine Funktion von *schmalspur* in neuronalen aber auch in mesodermalen Zellen. Wenn *schmalspur* durch das Transkript *CG13928* kodiert wird, sollte ein entsprechendes Expressionsmuster der mRNA nachweisbar sein. Es wurden spezifische RNA-Sonden hergestellt und an Wildtyp Embryonen getestet. In Stadium 5 Embryonen sind große Mengen maternaler mRNA nachweisbar (Abb. 48 A). In Embryonen des Stadiums 8-9 findet sich die mRNA in allen Geweben, so auch im Bereich des presumptiven Mitteldarms und des Mesoderms (Abb. 48 B). Von Stadium 10 an wird die Expression spezifischer. Es ist immer noch eine leichte Expression im Bereich des Mitteldarms und des Mesoderms nachweisbar, jedoch beginnt zu diesem Zeitpunkt verstärkt die Expression in neuronalem Gewebe. Stadium 11 Embryonen zeigen schon ausschließlich eine Expression in neuronalen Derivaten (Abb. 48 C, D).

Diese Nervensystem spezifische Expression bleibt bis zum Ende der Embryogenese erhalten. Ab Stadium 12-5 sind deutlich einzelne neuronale Cluster im peripheren Nervensystem zu erkennen (Abb. 48 E). In Stadium 15 Embryonen erkennt man eine durchgehende Expression im Neuropil des zentralen Nervensystems, die Zellen des peripheren Nervensystems befinden sich in dieser Abbildung außerhalb des Fokus (Abb. 48 F). Am Ende der Embryogenese (Stadium 16) ist eine zellspezifische Expression in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems nachweisbar. Die Ausschnittsvergrößerung von Zellen des peripheren Nervensystems zeigt, dass es sich bei den exprimierenden Zellen hauptsächlich um neuronale Zellen handelt (Abb. 48 H). Die Neurone des ventrolateralen und lateralen Clusters sind deutlich zu erkennen. Die mRNA ist z. T. auch in den dendritischen Fortsätzen der lateralen Chordotonalorgane nachweisbar (Abb. 48 H).

Die *CG13928* spezifische Sonde wurde auch für den mRNA Nachweis in Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums eingesetzt. Besonders auffällig ist die starke Expression in den Augenimaginalscheiben. Hier kommt es zu einer Expression im Bereich der morphogenetischen Furche und in allen sich entwickelnden Photorezeptor-Clustern. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt deutlich die Zellkörper der einzelnen Photorezeptoren (Abb. 48 I, J). Es konnte keine Expression in anderen Imaginalscheiben nachgewiesen werden.

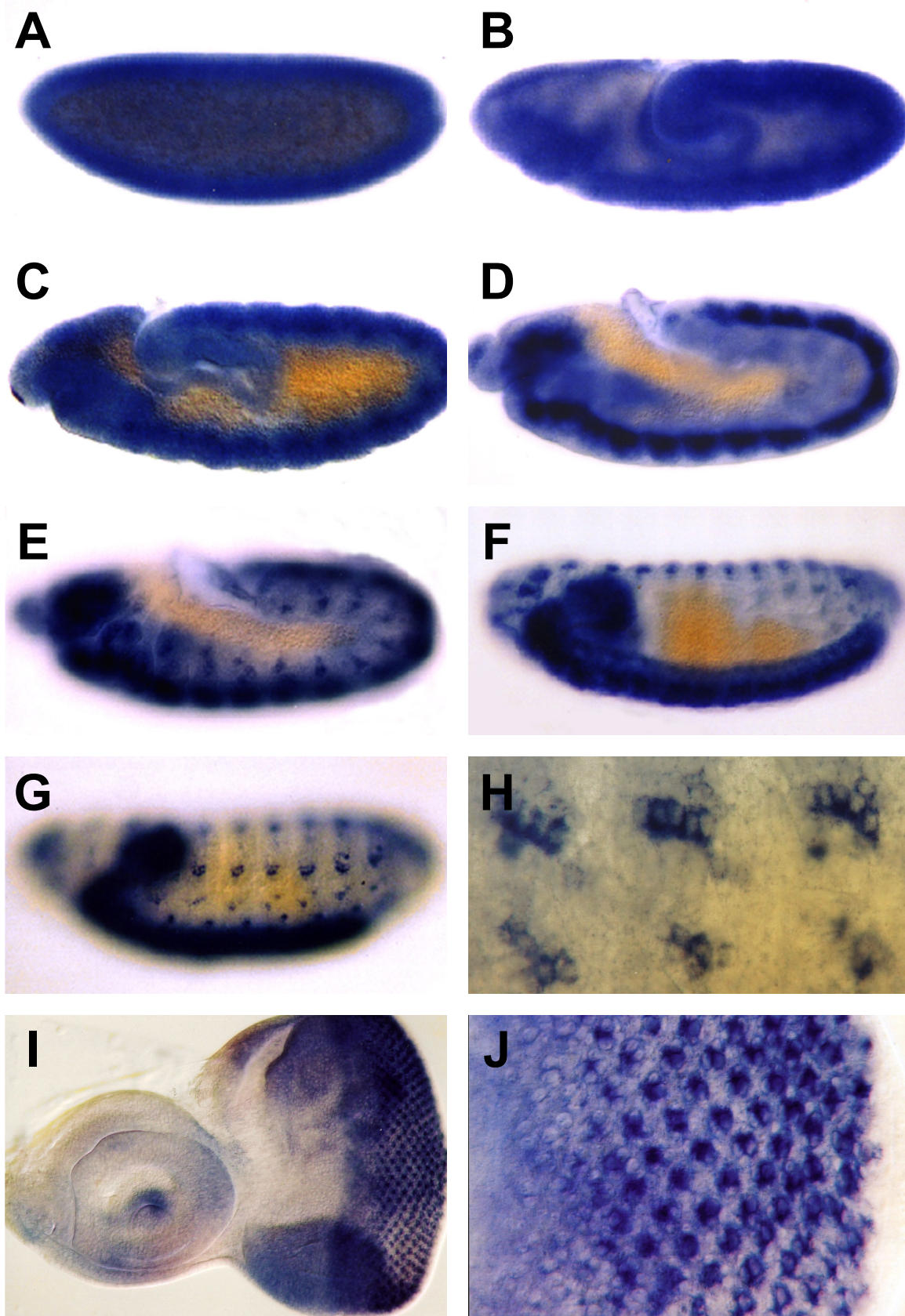


Abb. 48 Das mRNA Expressionsmusters von *schmalspur/CG13928*. Die mRNA Expression wurde durch Hybridisierung einer spezifischen DIG-markierten *anti-sense* Sonde von *CG13928* an *whole-mount* Embryonen nachgewiesen. Anterior ist links, dorsal oben. In Stadium 5 Embryonen ist eine maternale Komponente der mRNA nachweisbar. In frühen Entwicklungsstadien ist die *CG13928* mRNA in allen Geweben zu finden (B, C). Ab Stadium 12 kommt es zu einer spezifischen Expression in den neuronalen Zellen des ZNS und PNS (D-H). Postembryonal ist *CG13918* in der morphogenetischen Furche und in den Photorezeptorzellen der Augenimaginalscheibe exprimiert (I, J).

Das Transkript *CG13928* ist in allen Geweben exprimiert, die in *schmalspur* mutanten Embryonen Defekte aufweisen. Die starke maternale Komponente weist auf mögliche weitere Funktionen von *schmalspur* für der Embryonalentwicklung hin, die durch eine Analyse der zygotischen Komponente des Gens nicht aufgedeckt werden können. Die maternale Komponente kann möglicherweise auch zu der Variabilität der zygotischen Phänotypen *schmalspur* beitragen.

3.4.4 Analyse der postembryonalen Funktionen von *schmalspur*

Sowohl die Analyse der Expression von *CG13928* als auch die Analyse der hypomorphen, P-Element induzierten *schmalspur* Allele zeigte, dass *schmalspur* für die Augenentwicklung von *Drosophila* benötigt wird. Um diese *schmalspur* Funktion genauer charakterisieren zu können, wurden die *schmalspur* EMS-Allele auf das Chromosom FRT80B rekombiniert, das die Generierung von mutanten Zellklonen ermöglicht (s.o.). Für alle drei EMS-Allele konnten rekombinante Chromosomen hergestellt werden. Im ersten Ansatz wurden *heat-shock* induzierte Augenklone hergestellt. Hierfür wurde ein *arm-lacZ* markiertes Gegenchromosom verwendet, so dass die mutanten Zellklone eindeutig identifiziert werden konnten. Die Induktion von Zellklonen mit der *hsFlp*-Technik führt im Wildtyp zur Entstehung eines mutanten Zellklons und eines gleich großen wildtypischen Zwillingsklons.

Abbildung 49 zeigt zwei Beispiele für Augenscheiben, die nach entsprechendem Hitzebehandlung immunhistochemisch analysiert wurden. Bei beiden Scheiben ist deutlich der große Zwillingsklon erkennbar, da die Zellen des Zwillingsklon zwei Kopien des *arm-lacZ* Konstruktes besitzen und dementsprechend höhere Level β -Galactosidase exprimieren. Mutante Zellklone sind entweder gar nicht detektierbar (Abb. 49 H) oder aber sehr klein in Relation zum Zwillingsklon (Abb. 49 E). Die gleichzeitige Analyse der Augenscheiben mit dem kernständigen neuronalen Marker anti-Elav zeigt, dass die sehr kleinen mutanten Zellklone die Elav Expression in den Photorezeptorzellen nicht beeinträchtigen. *schmalspur* wird für die Entwicklung der Zellen der Augenimaginalscheibe benötigt. Fehlt *schmalspur*, so entwickeln sich die mutanten Zellen nicht weiter und tragen nicht zum adulten Auge bei (Daten nicht gezeigt). Ob *schmalspur* für die Zellteilung, das Zellwachstum oder die Zelldeterminierung benötigt wird kann anhand dieser Experimenten nicht bestimmt werden.

Zur genaueren Analyse dieses Phänotyps wurden auch Augenklone mit der *eyFlp*-Technik generiert. Hier haben die klonalen Zellen einen Entwicklungsvorteil gegenüber den restlichen Zellen, da ein Gegenchromosom verwendet wurde, das eine *Minute*-Mutation trägt

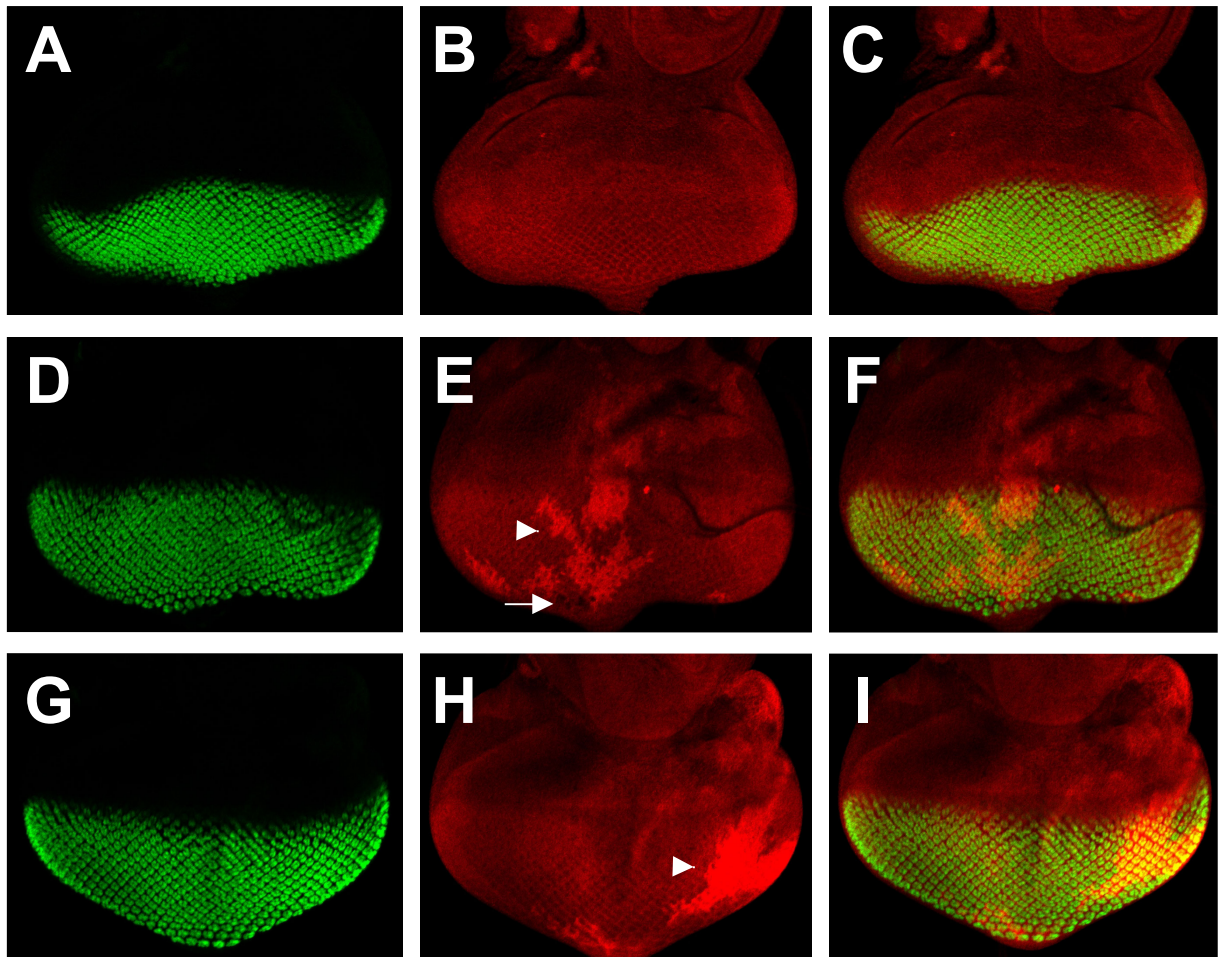


Abb. 49 Analyse der *schmalspur* Augenklone. Präparationen von Augennimagnalscheiben, anterior ist oben. Die Identifizierung und Charakterisierung der *schmalspur* mutanten Zellen erfolgte mit dem mAb anti-Elav (grün) und einem polyklonalen anti- β -Galactosidase Antikörper (rot). (A-C) Wildtyp, (D-I) *hsFlp sur^{D4-19}*. *schmalspur* mutante Augenklone wurden mit der *hsFlp*-Technik induziert. Es wurde ein *arm-lacZ* markierte Gegenchromosom verwendet, so dass die *schmalspur* mutanten Zellen anhand der Abwesenheit der β -Galactosidase Expression erkannt werden konnten. Im Normalfall sind der mutante Klon und der wildtypische Zwillingklon, der anhand der stärkeren *arm-lacZ* Expression zu erkennen ist, gleich groß. Es konnten nur sehr kleine *schmalspur* mutante Klone (E, Pfeil) aber relativ große Zwillingklone (E, H, Pfeilspitzen) erzeugt werden. In den mutanten Zellen ist eine normale Elav-Expression nachweisbar.

Ergebnisse

(Newsome et al., 2000). Diese Mutation führt zum Absterben des Zwillingsklons und verlangsamt die Entwicklung der heterozygoten Zellen. Diese Technik führt dazu, dass bis zu 95% der Zellen der Augenheimmaginalscheibe homozygot mutant sein können. Die so erzeugten *schmalspur* mutanten Augenscheiben zeigen einen sehr starken Phänotyp. Die Größe der Augenscheibe ist reduziert und es gibt nur noch einen kleinen Bereich mit differenzierten Photorezeptorzellen (Abb. 50 D-E). Diese Zellen exprimieren die beiden neuronalen Antigene Elav und HRP. Die Antennenimaginalscheibe und der Bolwig-Nerv, denen *schmalspur* nicht fehlt, sind normal differenziert. Dass es sich bei den verbleibenden Photorezeptor-Zellen nicht um *schmalspur* mutante Zellen, sondern um heterozygote Zellen handelte, wurde bei der Analyse der resultierenden adulten Tiere deutlich.

Ein Großteil der Tiere mit einem *eyFlp* induzierten *schmalspur* Klon ist nicht in der Lage die Puppe zu verlassen und stirbt. Grund hierfür ist, dass die *eyFlp* Klone nicht nur das Auge betreffen, sondern auch andere Bereiche des Kopfes. Die *schmalspur eyFlp* Tiere besitzen nur einen sehr kleinen Kopf und sind nicht mehr in der Lage die Puppenhülle aufzubrechen. In Abbildung 51 ist der Größenvergleich mit dem Wildtyp dargestellt. Die gesamten Köpfe entsprechen in ihrer Größe einem Wildtyp-Auge. Die dargestellten Tiere wurden freipräpariert und sind dann normal lebensfähig. Die Augen sind reduziert auf wenige Ommatidien, die den Elav-positiven Zellen in Abbildung 50 D-F entsprechen. Da alle Ommatidien rot gefärbt sind, handelt es sich hierbei um heterozygote Zellen (*schmalspur* mutante Zellen wären weiß) (Abb. 51 B, C). *schmalspur* ist essentiell für die Entwicklung des Komplexauges.

3.4.5 Analyse des Schmalspur/CG13928 Proteins

Das Gen *schmalspur/CG13928* kodiert für ein 245 Aminosäuren großes Protein. In den Datenbanken ist bisher kein eindeutiges Homolog zu finden, allerdings zeigte der Vergleich mit genomischen Sequenzen von *Anopheles Gambiae*, dass es hier möglicherweise ein Homolog geben könnte. Da die Analyse und besonders die Vorhersage der translatierten Sequenzen dieses Genoms erst kürzlich begonnen hat, sind nur partielle Sequenzen von möglichen Homologen zu finden. Innerhalb der CG13928 Proteinsequenz findet sich eine bekannte Proteindomäne, ein PHD Finger (Abb. 53, blau unterlegte Sequenz). Hierbei handelt es sich um einen C₄HC₃-Domäne, die 2 Zink²⁺-Ionen in ähnlicher Weise wie der RING-Finger bindet (Pascual et al., 2000; Capili et al., 2001). Bisherige Analysen zeigten, dass PHD-Finger Domänen an Chromatin-vermittelter transkriptioneller Regulation beteiligt sind. Die

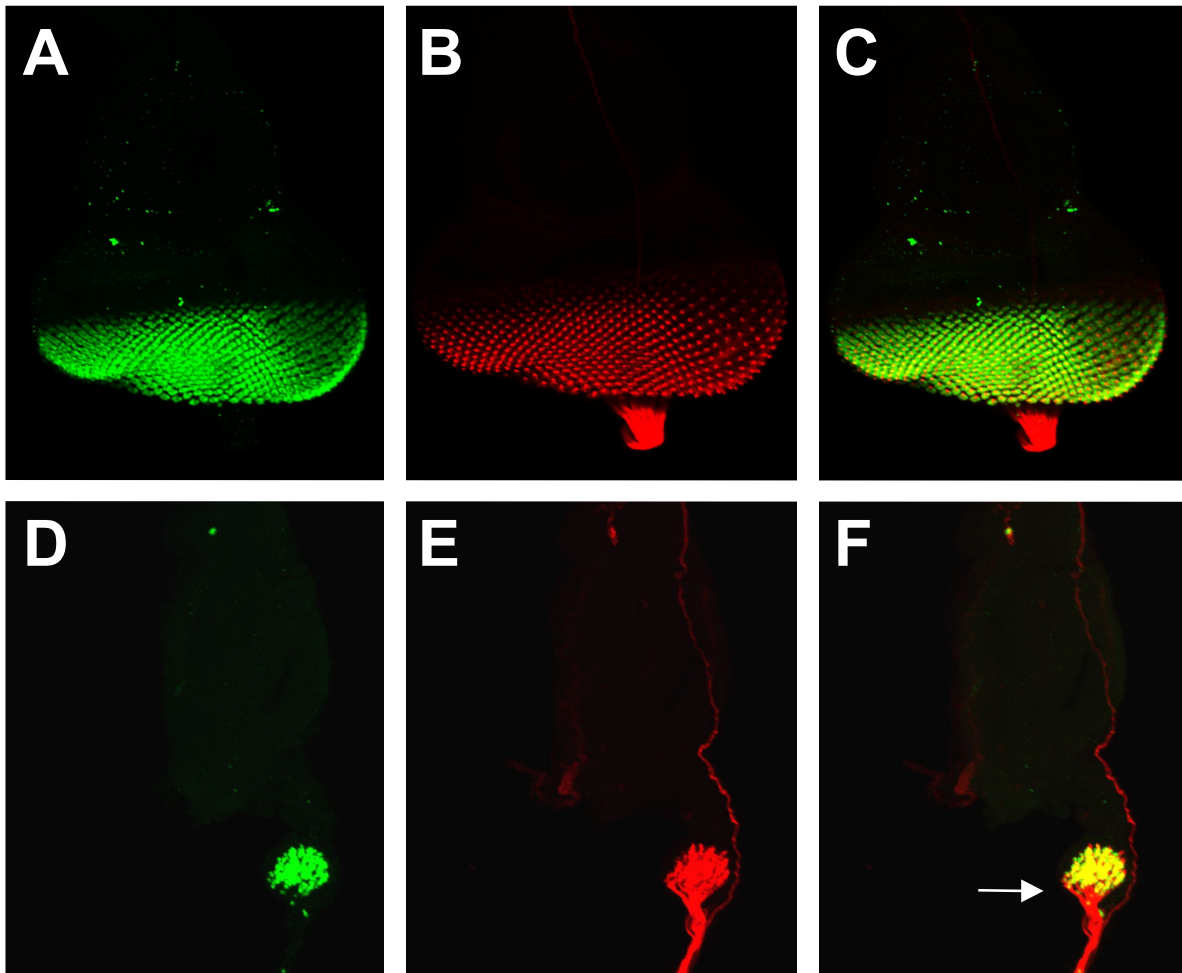


Abb. 50 Analyse der *schmalspur* Augenklone II. Präparationen von Augenimaginalscheiben, anterior ist oben. Die Augenimaginalscheiben wurden mit dem mAb anti-Elav (grün) und anti-HRP (rot) analysiert. (A-C) Wildtyp; (D-F) *eyFlp sur^{D4-19}*. Große *schmalspur* mutante Augenklone wurden mit der *eyFlp*-Technik erzeugt. Der Verlust von *schmalspur* führt zu einem Verlust des größten Teils der Augenimaginalscheibe (D-E). Bei den verbleibenden Elav- und HRP-positiven Zellen handelt es sich um heterozygote Zellen (siehe Abb. 51).



Abb. 51 Analyse der *schmalspur* Augenklone III. Laterale Ansicht der Komplexaugen, anterior ist links. (A) Wildtyp; (B) *eyFlp sur^{D1-38}*; (C) *eyFlp sur^{D4-19}*. Die Analyse der adulten Tiere nach einer Induktion von *schmalspur* Augenklonen mit *eyFlp* zeigt, dass die Elav-positiven Zellen in der Augenimaginalscheibe heterozygote Zellen sind. *schmalspur* mutante Zellen wären weiß. Der gesamte Kopf der Tiere ist deutlich verkleinert (Die Bilder A-C wurden mit der gleichen Vergrößerung aufgenommen).

Ergebnisse

PHD-Domäne vermittelt wahrscheinlich Protein-Protein Interaktion mit anderen transkriptionellen Regulatoren. Die Domäne findet sich bisher nur bei kernständigen Proteinen.

```
MADNNNCPKC KKSIAAKEAT SIGCSGEDCR RRYHRTCNI DDAVFEAIQK 50
NSMISFHCDE CKNQSPRAFA AKLHTIEEKV NKVCNGVNQI QGRMYQQYFQ 100
FGNQPLQALG ASAAGVGGGG LGGGLDGKHH PQQNNLIVVG NNCNSDRLQV 150
VCDYGRWVQV GKFATNTSEE DVIDHLAEEL KINKNLVKCT KLVKNDANLS 200
QLSYCKFKIS IPDYRENELE NEAIWPSGVM VSPFTPRSQL NQNRL 245
```

Abb. 52 Die Aminosäuresequenz des CG13928/Schmalspur Proteins. *CG13928* kodiert für ein 245 Aminosäuren großes Protein mit einer PHD-Finger Domäne. Die entsprechende Sequenz ist blau unterlegt, die Cysteine (rot) und das zentrale Histidin (blau) der C₄HC₃ Struktur sind farbig gekennzeichnet.

Um zu überprüfen, ob *CG13928* tatsächlich *schmalspur* entspricht, wurde begonnen, die kodierende Sequenz von *CG13928* in den *schmalspur* EMS-Allelen zu überprüfen. Bei der Sequenzierung des ersten *schmalspur* Allels *sur*^{D4-19} konnte kein Aminosäure-Austausch festgestellt werden. Die Analyse der beiden übrigen Allele steht noch aus.

3.4.6 Funktionelle Analyse von *schmalspur/CG13928*

Eine weitere Methode zur Verifizierung der Identität von *schmalspur* ist die Reversion des *schmalspur* Phänotyps durch eine zellspezifische Expression von *CG13928*. Die *CG13928* cDNA *GH11843* wurde direktional über Restriktionen mit *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pUAST kloniert. Positive Klone wurden per Restriktions- und Sequenzanalyse überprüft. Die entsprechende DNA wurde in *w*¹¹¹⁸-Embryonen nach Standardmethoden injiziert und erfolgreiche Integrationsereignisse des Konstruktes in das Genom über die Augenfarbe selektioniert. Es konnten 6 unabhängige transgene Linien für UAS-*CG13928* isoliert werden.

3.4.6.1 Auswirkungen der ektopischen Expression von *schmalspur/CG13928*

Zunächst wurden die Auswirkungen der ektopischen Expression des Konstruktes in unterschiedlichen Geweben getestet. Alle erzielten Phänotypen zeigten eine deutliche Dosis-Abhängigkeit. Die gleichzeitige Expression von 2 Kopien *CG13928* führt zu stärkeren

Ergebnisse

Effekten als die Expression einer Kopie. Die ektopische Expression führt gewebsspezifisch zu unterschiedlich Phänotypen. Die ubiquitäre (*da-GAL4*) oder mesodermspezifische (*24B-GAL4*) Expression führt zu embryonaler Letalität, die Expression in Mittellinienzellen (*rho-*, *sim-*, *sli-GAL4*) zu larvaler Letalität und die neuronale Expression (*sca-*, *elav-GAL4*) zu pupaler Letalität. Die Expression in adulten Geweben führt zu Störungen der Entwicklung der entsprechenden Gewebe. Obgleich die Expression im Nervensystem zur Letalität führt, konnte mit den Standard-Markern (BP102, 22C10) kein spezifischer embryonaler Phänotyp nachgewiesen werden.

Einige der adulten Phänotypen, die durch die ektopische Expression von *CG13928* erzielt wurden, sind in Abbildung 53 dokumentiert. Die Expression von 2 Kopien *CG13928* im Auge mit *ey-GAL4* führt zu einer Phänokopie des *eyFlp*-Phänotyps von *schmalspur* (Abb. 53 B, C). Es kommt zu einem kompletten Verlust der Augen und gleichzeitig ist die Größe des Kopfes deutlich reduziert (die Tiere mußten z.T. freipräpariert werden). Verwendet man nur eine Kopie *CG13928* so kommt es nur zu einer Verkleinerung des Auges (Abb. 53 D). Ebenso kommt es nach einer Expression in den Photorezeptoren (*GMR-*, *elav-GAL4*) zu einer Störung der Augenentwicklung (Abb. 53 E, F). Beide Treiber führen bei Verwendung von 2 Kopien des UAS-*CG13928* Konstruktes zu pupaler Letalität.

Die Expression in Neuroblasten und „Sensory Organ Precursors“ (SOPs) (*sca-GAL4*) führt dosisabhängig zu einem Verlust der Macro- und Microchaeten, die aus den SOPs hervorgehen (Abb. 53 H, I). Die Expression im posterioren Flügelbereich (*en-GAL4*) führt zu einer deutlichen Verkleinerung des posterioren Kompartiments (Abb. 53 K).

Die ektopische Expression von *CG13928* beeinträchtigt in allen analysierten Geweben die Entwicklung. Hierbei ist besonders auffällig, dass es immer zu einer Reduktion der Größe bzw. Anzahl der Zellen in der Expressionsdomäne kommt.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Phänotypen möglicherweise durch eine Störung der Zellproliferation zustande kommen, wurde versucht den Augenphänotyp (*ey-GAL4*) durch eine gleichzeitige Expression von *Cyclin E* zu revertieren (Jiao et al., 2001). Tatsächlich konnte der „*eyeless*“ Phänotyp durch die simultane Expression von *Cyclin E* revertiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine solcher „*eyeless*“ Phänotyp und die spezifische Rettung durch *Cyclin E* ist nicht nur bei zellzyklus-spezifischen Genen möglich, sondern auch bei Transkriptionsfaktoren, die normalerweise nicht im Auge exprimiert werden (Jiao et al., 2001). Da aber auch der Verlust von *CG13928* zu einem spezifischen Augenphänotyp führt,

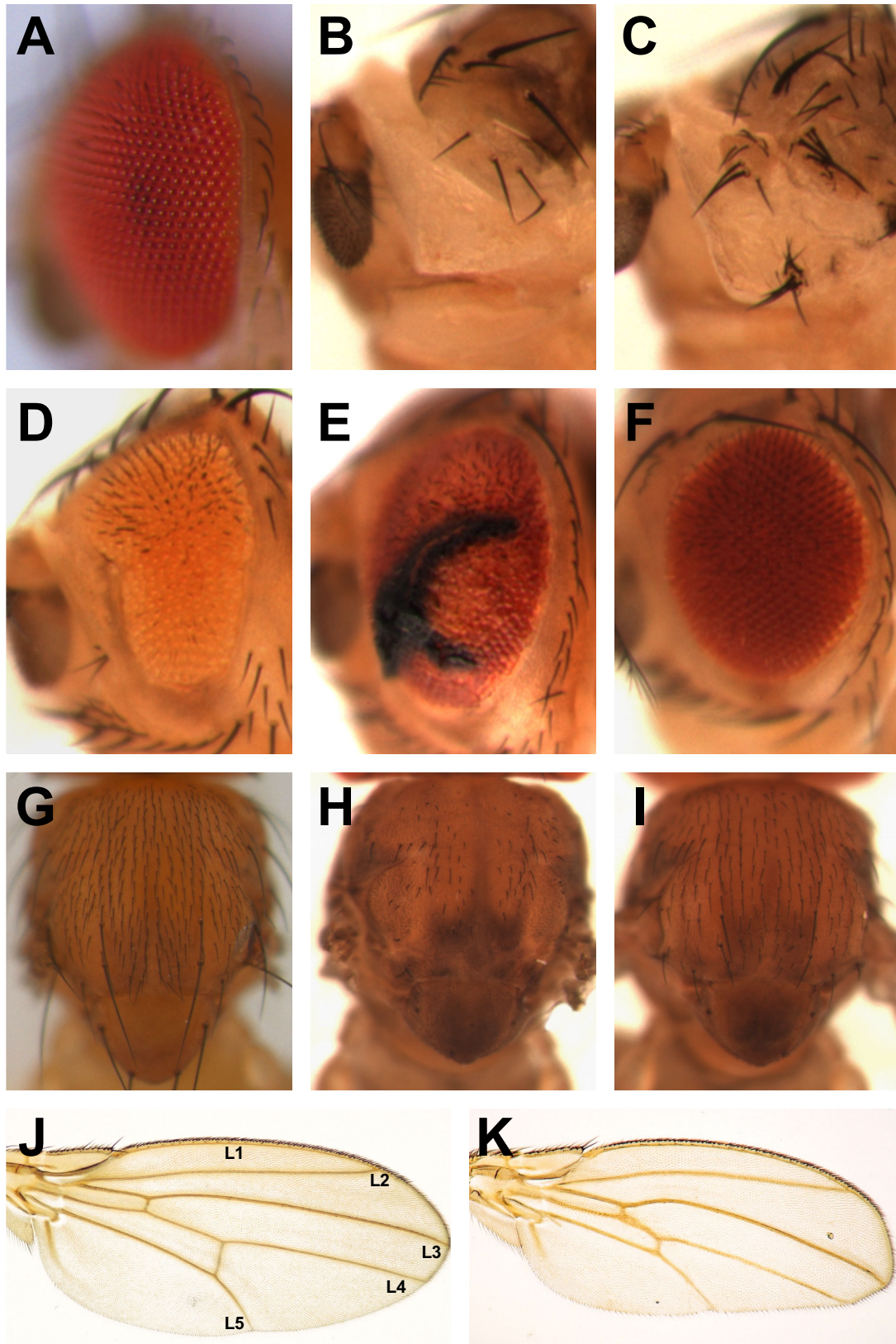


Abb. 53 Analyse der Effekte einer ectopischen Expression von *schmalspur/CG13928*. Darstellungen der Augen (A-F), des Thorax (G-I) und der Flügel adulter Fliegen (J, K). (A, G, J) Wildtyp; (B, C) *ey-GAL4/2xUAS-CG13928*; (D) *ey-GAL4/UAS-CG13928*; (E) *GMR-GAL4/UAS-CG13928*; (F) *elav-GAL4/UAS-CG13928*; (H) *sca-GAL4/2xUAS-CG13928*; (I) *sca-GAL4/UAS-CG13928*; (K) *en-GAL4/UAS-CG13928*. Die ectopische Expression von *schmalspur/CG13928* führt zu dosisabhängigen Beeinträchtigungen der Entwicklung der entsprechenden Gewebe.

Ergebnisse

ist es eher wahrscheinlich, dass *CG13928* und somit *schmalspur* an der Regulation der Zellproliferation bzw. des Zellwachstum im Auge beteiligt sind.

3.4.6.2 Reversion des *schmalspur* Phänotyps

Zur Reversion der *schmalspur* Phänotypen wurden Rekombinanten der *schmalspur* EMS-Allele mit der dritschromosomalen Insertion UAS-*CG13928^l* hergestellt. Gleichzeitig wurden Rekombinanten mit verschiedenen Treiberlinien erzeugt (u.a. *da-*, *sim-*, *rho-*, *elav-*, *sca*-GAL4). Die immunhistochemische Analyse der entsprechenden Embryonen, die *CG13928* im *schmalspur* mutanten Hintergrund exprimierten, zeigte, dass keine phänotypische Rettung möglich war.

Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund ist, dass die Expression des Transkriptes im mutanten Hintergrund nicht genau genug mit dem endogenen Expressionsmuster von *schmalspur* übereinstimmte. Momentan wird versucht die *schmalspur* Phänotypen durch eine Veränderung der Dosis und die Verwendung anderer Treiberlinien zu revertieren.

Die Summe der genetischen und molekularen Daten legt nahe, dass *schmalspur* dem Gen *CG13928* entspricht. Es kodiert für ein hauptsächlich neuronal exprimiertes Protein, das eine PHD-Finger Domäne besitzt und möglicherweise an der Kontrolle der Transkription beteiligt ist.

4. Diskussion

Wesentliche Aspekte der Entwicklung und Funktion eines Nervensystems werden durch die direkte Interaktion von Neuronen und Gliazellen kontrolliert. Für ein genaueres Verständnis der Neuron-Glia Interaktionen in *Drosophila* auf morphologischer und molekularer Ebene wurde die Interaktion der beiden Zelltypen im Wildtyp und in spezifischen Mutationen untersucht. Die detaillierte phänotypische und molekulare Analyse der Funktionen von *klötzchen*, *kästchen* und *schmalspur* während der Entwicklung des embryonalen Nervensystems und des adulten Auges, hat zu neuen Erkenntnissen über die Kontrolle der funktionellen Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen geführt.

4.1 Analyse der Mittelliniengliazellen im Wildtyp

Die konfokale Analyse der Neuron-Glia Interaktion in der Mittellinie zeigt eine, bisher nicht beschriebene, direkte Interaktion der ML-Gliazellen mit Axonen der longitudinalen Konnektive. Die ML-Gliazellen bilden mindestens drei lange zellulären Fortsätze innerhalb der Konnektive, die möglicherweise in Kontakt mit den drei Fasciclin II-positiven Axonbündel stehen. Diese Neuron-Glia Interaktionen könnten an der Positionierung der longitudinalen Axone beteiligt sein. Die Axone finden ihre Position innerhalb der Konnektive durch eine differentielle Expression der drei Robo-Rezeptoren. Eine Veränderung des „Robo-Kodes“ in einzelnen Axonen z. B. des mittleren Faszikels führt zu der Assoziation mit einem anderen der drei Faszikel, nicht aber zu einer intermediären Position (Rajagopalan et al., 2001b; Simpson et al., 2001b).

Die ML-Gliazellen, die den repulsiven Liganden für Robo, das Slit Protein exprimieren (Rothberg et al., 1988; Kidd et al., 1999; Brose et al., 1999), könnten über ihre zellulären Ausläufer den repulsiven Liganden direkt innerhalb der Konnektive präsentieren und so die Sortierung der Axone in die einzelnen Faszikel erleichtern. Als Argument für die Existenz eines Slit-Gradienten, der die Positionierung der longitudinalen Axone bestimmt, wurde bislang der Nachweis geringer Slit-Proteinmengen entlang der Konnektive angeführt (Rothberg et al., 1990; Kidd et al., 1998a; Kidd et al., 1998b). Da jedoch kein echter Slit Gradient innerhalb des ZNS, sondern nur geringe Slit Mengen entlang der longitudinalen Axone gefunden wurden, erscheint eine Verteilung von Slit über die langen, zellulären Ausläufer der ML-Gliazellen deutlich wahrscheinlicher. Zudem war es bisher nicht möglich, die Mengen des Slit Proteins, das von den ML-Gliazellen sekretiert wird, durch eine ektopische Expression zu erhöhen (Kidd et al., 1999). Ein weiteres Argument für eine direkte

Diskussion

Verteilung von Slit über die Fortsätze der ML-Gliazellen und gegen einen Slit-Gradienten ist, dass in hypomorphen *slit* Mutanten oder *slit* heterozygoten Embryonen keine Veränderung der Position der lateralen Faszikel zu beobachten ist, obgleich es zu einer Reduktion der Slit-Proteinmenge kommt (Kidd et al., 1999; Simpson et al., 2000b).

4.2 Analyse der Mutationen *klötzchen*, *kästchen* und *schmalspur*

Mutationen in *klötzchen*, *kästchen* und *schmalspur* wurden nach einer EMS-Mutagenese anhand ihres fusionierten Kommissurenphänotyps identifiziert (Hummel et al., 1999a). In homozygot mutanten Embryonen sind die ML-Gliazellen nicht mehr in der Lage die Axone der anterioren und posterioren Kommissur vollständig voneinander zu trennen. Die gerichtete gliale Migration ist abhängig von der Differenzierung der ML-Gliazellen, der axonalen Projektion der ML-Neurone, die das Substrat für die Migration bilden und von der korrekten Kommunikation zwischen den ML-Gliazellen und ML-Neuronen. Defekte einer Komponente dieses Prozesses führen zu einem „fusionierten Kommissuren“-Phänotyp (Klämbt et al., 1991; Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b).

Die initiale phänotypische Charakterisierung führte zu einer Einordnung der Mutationen in die sogenannte *pointed*-Gruppe, da die Mitglieder dieser Gruppe alle einen *pointed*-ähnlichen Phänotyp zeigen. Die Analyse von Doppelmutationen mit Genen, die entweder in den ML-Neuronen oder den ML-Gliazellen benötigt werden, deutete auf eine Funktion der drei hier bearbeiteten Gene in den ML-Gliazellen hin (Hummel et al., 1999a).

4.2.1 Analyse des Gens *klötzchen*

Der fusionierte Kommissurenphänotyp in *klötzchen* mutanten Embryonen ist primär auf Defekte in den ML-Gliazellen zurück zuführen. Die Analyse mit dem *sli*-GAL4/UAS-CD2 System hat gezeigt, dass in den ML-Gliazellen die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie beeinträchtigt ist. Die zellulären Fortsätze der ML-Gliazellen sind direkt nach der Delaminierung der Zellen aus dem Ektoderm reduziert und die Zellen sind später nicht in der Lage, die Kommissuren mit ihren basalen Zellausläufern zu umhüllen und voneinander zu trennen. Die Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie bei allen Schritten der glialen Migration deutlich von wildtypischen ML-Gliazellen. Eine mögliche Ursache für die Reduktion der zellulären Ausläufer ist eine Beeinträchtigung des Zytoskeletts, das für die Stabilisierung der Zellform und insbesondere der Zellfortsätze nötig ist.

4.2.1.1 Die molekulare Charakterisierung von *klötzchen*

Übereinstimmend mit diesen Befunden zeigte die molekulare Charakterisierung, dass *klötzchen* in der Region von α -*spectrin*, einer wesentlichen Komponente des Spectrin Zytoskeletts kartiert. Mehrere unabhängige *klötzchen* P-Elemente sind im ersten Intron von α -*spectrin* inseriert und komplementieren, ebenso wie die *klötzchen* EMS-Allele, keine der bekannten α -*spectrin* Mutationen. α -*spectrin* wird ubiquitär exprimiert und das Protein findet sich entlang der Zellmembran in allen Zelltypen. Innerhalb des zentralen Nervensystems konnte α -Spectrin sowohl in den ML-Gliazellen als auch den ML-Neuronen nachgewiesen werden. In *klötzchen* mutanten Embryonen kommt es am Ende der Embryonalentwicklung zu einer Reduktion der α -Spectrin Proteinmenge. Da auch die Expression eines α -*spectrin* Minigens eine Reversion der *klötzchen* Letalität ermöglicht, ist der Verlust von α -Spectrin für die morphologischen Defekte der ML-Gliazellen und die Entstehung des fusionierten Kommissuren Phänotyps verantwortlich.

Die phänotypische, genetische und molekulare Analyse der *klötzchen* Region führte zu einer Reihe widersprüchlicher und komplexer Befunde, die bisher eine eindeutige Aussage über die molekulare Identität von *klötzchen* nicht ermöglichen. Im folgenden möchte ich verschiedene, denkbare Modelle bezüglich der Identität von *klötzchen* darlegen. Aufgrund der Insertion der P-Element induzierten *klötzchen* Allele in das erste Intron von α -*spectrin* und *CG32315* könnten beide Gene für *klötzchen* kodieren. Die *klötzchen* Mutationen könnten aber auch beide Transkripte gleichzeitig betreffen.

A) *klötzchen* entspricht α -*spectrin*

Für dieses Modell würde sprechen, dass die *klötzchen* Allele die α -*spectrin* Mutationen nicht komplementieren und die mit *klötzchen* assoziierte Letalität durch die ubiquitäre Expression eines α -*spectrin* Minigens revertierbar ist. Mehrere Argumente sprechen aber gegen diese Annahme: Die α -*spectrin* Null Mutation α -*spec*^{rg41} führt im Gegensatz zu den *klötzchen* Allelen nicht zu einem embryonalen ZNS Phänotyp. In mutanten Embryonen und Augenklonen kommt es bei allen *klötzchen* Allelen zu einem nahezu vollständigen Verlust des α -*spectrin* Proteins und der α -*spectrin* mRNA. Die unterschiedlichen *klötzchen* EMS-Allele müssten folglich Defizienzen der genomischen Region von α -*spectrin* sein. Es könnte dann aber nicht zu der beobachteten phänotypischen Varianz zwischen den *klötzchen* Allelen und dem molekular definierten α -*spectrin* Null-Allel kommen. Die *klötzchen* Allele können daher keine Mutationen des α -*spectrin* Gens sein.

Diskussion

Alternativ wäre auch denkbar, dass die *klötzchen* Mutationen antimorphe Allele von α -spectrin sind und so die Entwicklung des Nervensystems beeinträchtigen. Da es in *klötzchen* mutanten Embryonen und Klonen der Augenscheibe jedoch zu einem Verlust des α -Spectrin Proteins und der α -spectrin mRNA kommt und dieser Verlust von α -Spectrin zusätzlich durch eine Western Blot Analyse bestätigt wurde (T. Stork, pers. Mitteilung), kann auch diese Hypothese ausgeschlossen werden.

B) Die *klötzchen* Mutationen betreffen α -spectrin und CG32315

Der gleichzeitige Funktionsverlust von beiden Genen würde einen Großteil der Befunde erklären. Hierbei wäre der Verlust von α -spectrin für die Letalität der *klötzchen* Allele verantwortlich und nur bei einem gleichzeitigen Verlust von CG32315 käme es zu einer Störung der Entwicklung des Nervensystems. Dementsprechend wäre die Reversion der Letalität durch die Expression eines α -spectrin Minigen möglich und die Reversion des ZNS-Phänotyps durch eine Expression von CG32315 im Hintergrund der *klötzchen* Mutationen. Da es in *klötzchen* mutanten Augenklonen nicht nur zu einem Verlust des α -Spectrin Proteins sondern auch der α -spectrin mRNA kommt, müssten die *klötzchen* Mutationen entweder Deletionen der α -spectrin/CG32315 Region sein oder die Transkription der gemeinsamen prä-mRNA betreffen.

Durch eine Sequenzanalyse konnte nachgewiesen werden, dass in den einzelnen *klötzchen* EMS-Allelen der genomische Bereich des Gens CG32315 nicht deletiert ist. Es besteht somit nur noch die sehr unwahrscheinliche Möglichkeit, dass es gleichzeitig zu einer Deletion des α -spectrin spezifischen Bereiches und einer Induktion von Punktmutationen in CG32315 gekommen ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass solche Deletionen durch EMS induziert werden, ist sehr gering. Alternativ könnten auch *amber*-Mutationen innerhalb des α -spectrin Gens zu einer Degradierung der entsprechenden mRNA führen. Dieses Phänomen des „nonsense-mediated decay“, also der spezifischen Degradierung von mRNA mit zusätzlichen Stopp-Kodons, ist für Säuger-Zellen gut beschrieben, bei *Drosophila* aber bisher noch nicht nachgewiesen worden (Wilkinson and Shyu, 2001; Mendell and Dietz, 2001). Da es mindestens drei unabhängig induzierte *klötzchen* EMS-Allele gibt, kann diese Hypothese mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Entstehung von DNA-Abberationen, die die Transkription der gemeinsamen prä-mRNA beeinflussen ist zwar wahrscheinlicher als die gleichzeitige Induktion von Deletionen und Punktmutationen, kann aber die beobachtete phänotypische Varianz der *klötzchen* EMS-

Diskussion

Allele nicht erklären. Zudem konnte durch erste *RNAi*-Experimente gezeigt werden, dass *CG32315* ein essentielles Gen für die Entwicklung von *Drosophila* ist und der Verlust beider Genfunktionen durch *RNAi* zu ähnlichen Phänotypen führt. Daher kann auch diese Hypothese mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Zur Sicherheit wird momentan die 5' regulatorische Region der beiden Gene in den *klötzchen* Mutationen analysiert.

C) *klötzchen* entspricht *CG32315*, einem Regulator der α -spectrin mRNA Stabilität

Wenn *CG32315* ein direkter Regulator der α -spectrin mRNA Stabilität wäre, würden einfache Punktmutationen in diesem Gen zu einer Reduzierung sowohl der maternalen als auch der zygotischen α -spectrin mRNA führen. Im Unterschied zu der Mutation α -spec^{rg41} käme es zu einem zeitlich früheren und folglich quantitativ größerem Verlust an α -Spectrin Protein in *klötzchen* mutanten Embryonen. Der ZNS-Phänotyp und alle anderen beobachteten Phänotypen würden aufgrund des Verlustes von α -Spectrin zustande kommen. Die Expression von zusätzlichem α -spectrin kann so die *klötzchen* Letalität retten. Der große Vorteil dieser Hypothese ist, dass der Charakter der EMS induzierten Mutationen plausibler ist und mit den gefunden Aminosäureaustauschen innerhalb des *CG32315* Proteins übereinstimmen würde. Die *RNAi*-Befunde deuten ebenfalls auf eine essentielle Funktion von *CG32315* und die Ähnlichkeit der induzierten Phänotypen legt eine direkte Interaktion zwischen beiden Genen nahe. Eine genetische Interaktion zwischen *CG32315* und α -spectrin konnte durch die Expression eines trunkierten *CG32315* Proteins nachgewiesen werden. Die α -spectrin und besonders die *klötzchen* EMS-Mutationen verstärken den dominanten Phänotyp, der durch eine ektopische Expression des trunkierten *CG32315* Proteins hervorgerufen wird (Stork, 2002).

Im wesentlichen gibt es zwei Befunde die das Modell in Frage stellen. Erstens, es kommt zur Letalität transheterozygoter *klötzchen* und α -spectrin Tiere und zweitens, bisher ist es nicht möglich den α -Spectrin Verlust in *klötzchen* mutanten Embryonen durch eine Expression von *CG32315* zu retten. Eine synthetische Letalität zwischen beiden Mutationen erscheint durch die direkte Interaktion der beiden Gene durchaus plausibel. In *Drosophila* ist synthetische Letalität zwischen zwei Mutationen, die Gene eines Signalweges bzw. direkt miteinander interagierende Proteine betreffen, schon in mehreren Fällen beobachtet worden (Lucchesi, 1968; Vassin et al., 1985; Gertler et al., 1989; Giniger, 1998). Der zweite Befund läßt sich möglicherweise auf eine fehlende Übereinstimmung des ektopisch exprimierten Transkripts mit dem endogenen Expressionsmusters von *CG32315* zurückführen. Zur

Diskussion

endgültigen Klärung dieses Befundes sind zusätzliche Experimente mit weiteren GAL4-Treiberlinien zur Modifizierung des Expressionsmusters und der Expressionsstärke notwendig.

Eine genaue Analyse der DNA-Sequenz der gesamten α -spectrin/*CG2315* Region wird endgültig die molekulare Identität der *klötzchen* Mutationen klären. Das wahrscheinlichste Modell ist, dass *CG2315* für *klötzchen* kodiert, und dass *CG2315* für die Stabilität der α -spectrin mRNA benötigt wird. Die beobachteten Phänotypen kommen durch den nahezu kompletten Verlust des α -Spectrin Proteins während der Embryogenese zustande.

4.2.1.2 Die Funktion des Spectrin Zytoskeletts für die Entwicklung von *Drosophila*

Spectrine sind tetramere, filamentöses-Aktin (F-Aktin) vernetzende Proteine, die sich aus zwei α and zwei β Untereinheiten zusammensetzen (Bennett and Baines, 2001). Das submembranöse Spectrin-Zytoskelett besteht aus einem verzweigten Netzwerk von Spectrin und F-Aktin und ist durch eine Interaktion mit verschiedenen integralen Membranproteinen und Phospholipiden mit den unterschiedlichen Membrankompartimenten der Zelle assoziiert (De Matteis and Morrow, 2000). An der Plasmamembran bildet Spectrin zusammen mit dem kortikalen F-Aktin die strukturelle Basis für Veränderungen der Zellform und der Zellstabilität sowohl in epithelialen als auch in nicht-epithelialen Zellen. Sowohl in *Drosophila* als auch in *C. elegans* kommt es zur Bildung von 2 unterschiedlichen Spectrin-Isoformen, die die gleiche α -Untereinheit aber verschiedenen β -Untereinheiten besitzen.

In *Drosophila* Epithelzellen kommt es zu einer strikten räumlichen Trennung der unterschiedlichen Spectrin-Isoformen. $(\alpha\beta)_2$ -Tetramere sind im basolateralen Bereich der Zellen lokalisiert und $(\alpha\beta_H)_2$ -Tetramere in den apikalen Bereichen einschließlich der Zonula Adherens (ZA) (Dubreuil et al., 1997; Lee et al., 1997; Thomas et al., 1998; Thomas and Williams, 1999). Alle drei Spectrin Gene sind essentiell für die Entwicklung von *Drosophila*, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Funktion.

Der Verlust von α -spectrin und β -spectrin führt zu deutlich stärkeren Phänotypen und früheren Letalitätsphasen als der Verlust von β_H -spectrin. Während 50% der α -spectrin und 90% der β -spectrin mutanten Embryonen nicht schlüpfen (Lee et al., 1993; Dubreuil et al., 2000; Featherstone et al., 2001), so führen Mutationen in dem β_H -spectrin Gen *karst* nur zu einer Einschränkung der Vitalität. Ein Großteil der mutanten Tiere stirbt während der

Diskussion

Larvalentwicklung, aber es kommt auch zu vitalen Fliegen, die Defekte in der Augen- und Flügelentwicklung zeigen (Thomas et al., 1998).

4.2.1.2.1 Die Funktion der Spectrine während der Embryonalentwicklung

Der mutante Phänotyp von α - und β -spectrin wurde bisher nur für Zellen des larvalen Mitteldarms und für die neuromuskulären Synapsen im Detail untersucht, da lichtmikroskopische Analysen der mutanten Embryonen keine auffälligen morphologischen Veränderungen gezeigt haben (Lee et al., 1993; Dubreuil et al., 2000; Featherstone et al., 2001). In den Darmzellen werden die unterschiedlichen Spectrin-Isoformen für die Aufrechterhaltung der Zellform und der subzellulären Organisation innerhalb der Zellen benötigt. Hierbei kommt es zu unterschiedlichen Phänotypen in α - und β -spectrin mutanten Larven, die möglicherweise aufgrund einer größeren maternalen Komponente des α -Spectrin Proteins zustande kommen (Lee et al., 1993; Dubreuil et al., 2000).

Die maternale Komponente wird als Hauptgrund dafür angesehen, dass es zu einer relativ normalen Embryonalentwicklung der α -spectrin Mutanten kommt (Lee et al., 1993; Featherstone et al., 2001). Die maternale Komponente eines Gens setzt sich sowohl aus maternal synthetisiertem Protein und aus maternal synthetisierter mRNA zusammen. Da es während der Embryogenese von *Drosophila* zu einem mehr als 5-fachen Anstieg der α -Spectrin Proteinmenge kommt (Pesacreta et al., 1989), erscheint es unwahrscheinlich, dass eine normale Embryonalentwicklung von α -spectrin mutanten Embryonen alleine aufgrund des maternalen Proteins möglich ist. Die Entwicklung der mutanten Embryonen wird zu einem großen Teil von der Translation der maternalen mRNA abhängig sein, die in großen Mengen im Embryo nachzuweisen ist (Abb. 12 A). Der Verlust eines Gens, das die Stabilität der α -spectrin mRNA kontrolliert, würde die α -Spectrin Proteinmenge während der Embryogenese stärker reduzieren als zygotische α -spectrin Mutationen. Diese Differenz könnte die Unterschiede zwischen *klötzchen* und α -spectrin Mutationen erklären.

Im Vergleich zu *Drosophila* führt der Verlust der Spectrine in *C. elegans* zu starken Muskel- und Nervensystemphänotypen (Hammarlund et al., 2000; Moorthy et al., 2000; Narman and Moerman, 2001). Da das Spectrin-Zytoskelett in *C. elegans* aus den gleichen Spectrin-Isoformen zusammengesetzt ist wie in *Drosophila*, ist besonders interessant, dass der Phänotyp von α -spectrin Mutationen in *C. elegans* der Summe der Phänotypen der beiden β -spectrin Mutationen entspricht (Moorthy et al., 2000).

Diskussion

Eine erste Funktion von Spectrin für die Muskel- und Nervensystementwicklung in *Drosophila* konnte anhand einer Analyse der Synapsenfunktion der neuromuskulären Kontakte gezeigt werden (Featherstone et al., 2001). Am Ende der Embryogenese kommt es sowohl in α - als auch in β -spectrin Mutanten zu einer Fehlverteilung vieler präsynaptischer Proteine. Die Moleküle, die für die Ausschüttung der Neurotransmitter benötigt werden, sind nicht mehr distinkt in den Synapsen lokalisiert sondern finden sich im gesamten Axon. Als Konsequenz ist die Ausschüttung der Neurotransmitter und somit die Funktion der Synapse stark gestört. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass einzelne Proteine des postsynaptischen Kompartiments innerhalb der Muskeln fehlverteilt sind und die Muskeln in α -spectrin mutanten Embryonen dünner erscheinen (Featherstone et al., 2001). Obgleich das Spectrin-Zytoskelett für die korrekte Lokalisation vieler synaptischer Komponenten notwendig ist, kommt es nicht zu einer Beeinträchtigung der Morphologie der Synapsen. Wiederum wird angenommen, dass die maternale α -Spectrin Komponente für die Aufrechterhaltung der normalen Morphologie der Synapse in α -spectrin mutanten Embryonen verantwortlich ist (Featherstone et al., 2001).

Diese Studien, zusammen mit den Daten aus *C. elegans* zeigen eine klare Funktion von α -spectrin sowohl für die Muskel- als auch die Nervensystementwicklung (Featherstone et al., 2001; Hammarlund et al., 2000; Moorthy et al., 2000; Narman and Moerman, 2001). Die beobachteten embryonalen *klötzchen* Phänotypen kommen möglicherweise durch einen größeren und früheren Verlust von α -spectrin während der Embryogenese zustande, da sich nicht die generelle Qualität der Phänotypen sondern nur die quantitative Ausprägung ändert.

4.2.1.2.2 Die Entstehung des Phänotyps der Mittellinien-Gliazellen

Die Assoziation des Spectrin-Zytoskelett an die Plasmamembran erfolgt über eine Interaktion mit Adapterproteinen, die für eine direkte Verbindung mit integralen Membranproteinen sorgen (Bennett and Baines, 2001). Bisher konnten zwei Klassen von Adapterproteinen identifiziert werden, Ankyrine und Mitglieder der Protein 4.1 Familie. Während Ankyrin direkt an β -Spectrin bindet (siehe Abb. 9; Lombardo et al., 1994) bilden die Proteine der Klasse 4.1 einen Komplex zwischen der Aktin-bindenden Domäne von β -Spectrin und F-Aktin (Marfatia et al., 1997).

In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass für die apikale Anordnung der $(\alpha\beta_H)_2$ -Spectrine eine direkte Interaktion mit dem integralen Membranprotein Crumbs

Diskussion

notwendig ist. $(\alpha\beta_H)_2$ -Spectrine bilden einen Proteinkomplex mit Crumbs, dem 4.1 Protein DMoesin und Discs lost (Dlt) (Medina et al., 2002). Diese Befunde zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Organisation der Polarität, der Stabilität der Verbindung zwischen Zellen und der Morphogenese der Zellen. Der Verlust von Crumbs führt zu einer Fehlverteilung von β_H -Spectrin in Epithelzellen. Gleichzeitig führt der Verlust von β_H -Spectrin im Follikelzellepithel ebenso wie der Verlust von Crumbs zu einer Störung der Zonula Adherens, die für die Zell-Zell Interaktion notwendig ist (Zarnescu and Thomas, 1999; Grawe et al., 1996). Betrachtet man in diesem Zusammenhang den ML-Glia Phänotyp der *klötzchen* mutanten Embryonen, so wird deutlich, dass eine Störung der Organisation der ZA und der apikalen Domäne innerhalb des ektodermalen Epithels zu einer frühzeitigen Retraktion des apikalen Zellfortsatzes der ML-Gliazellen führen kann.

Übereinstimmend mit diesen Befunden führen hypomorphe *crumbs* Mutationen zu Defekten bei der Trennung der Kommissuren (T. Hummel und C. Klämbt, pers. Mitteilung), obgleich *crumbs* nur in den epithelialen Vorläuferzellen, nicht aber in den delaminierten Neuronen oder Gliazellen exprimiert wird (Tepass et al., 1990). Die frühe Störung der polaren Anordnung des Spectrin-Zytoskeletts in den Epithelzellen kann so Auswirkungen auf die Morphologie und das Verhalten der ML-Gliazellen haben.

4.2.1.2.3 Die Funktion von α -spectrin/CG32315 bei der Augenentwicklung

Die direkte Interaktion von β_H -Spectrin mit Crumbs erklärt möglicherweise auch die beobachteten Phänotypen der *klötzchen* Augenklone und die Beeinträchtigung der Augenentwicklung durch die Expression der α -spectrin und *CG32315 RNAi*-Konstrukte. Der Verlust von *crumbs* führt ebenso wie der Verlust von *klötzchen* und α -spectrin zu einem Augenphänotyp (Pellikka et al., 2002, Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002). Interessanterweise sind weder in *klötzchen* noch in *crumbs* mutanten Augenscheiben im dritten Larvalstadium offensichtliche Defekte der neuronalen Differenzierung oder Zellmorphologie erkennbar (E. Knust, pers. Mitteilung; Johnson et al., 2002). Crumbs wird erst in späteren, pupalen Stadien für die Aufrechterhaltung der ZA und für die Ausbildung der Stielmembran der Photorezeptoren benötigt (Pellikka et al., 2002, Izaddoost et al., 2002). Hierbei kommt es erneut zu einer direkten Interaktion von Crumbs, Dlt und β_H -Spectrin. In *crumbs* mutanten Augen kommt es zu einem Verlust von β_H -Spectrin im apikalen Bereich der Zellen; die Verteilung von α -Spectrin ist nicht wesentlich beeinträchtigt (Pellikka et al., 2002).

Diskussion

Obgleich die direkte Beteiligung von α -Spectrin bei diesen Prozessen bislang nicht gezeigt wurde, so erscheint sie aufgrund der Lokalisation von α -Spectrin in den apikalen Kompartimenten der Photorezeptoren (siehe Abb. 13 A) und der in allen anderen Geweben gezeigten direkten Abhängigkeit der beiden Proteine voneinander sehr wahrscheinlich (Lee et al., 1997; Zarnescu and Thomas, 1999). Auch β -Spectrin ist möglicherweise für die Photorezeptorentwicklung notwendig, da es analog zu α -Spectrin in den apikalen Bereichen der Photorezeptorzellen exprimiert wird (Abb. 16; Jasper et al., 2002). Die ersten Analysen von *α -spectrin* und *CG32315* deuten auf weiterreichende Rollen der beiden Gene bei der Organisation des adulten Auges hin. Bei der Expression der *RNAi*-Konstrukte und des trunktierten *CG32315* Proteins in der Augenscheibe kommt es zu einer Reduktion des ventralen Kompartiments des Auges. Dieser Phänotyp ist, ebenso wie der Phänotyp von *klötzchen* mutanten Augenklonen, deutlich stärker als der Phänotyp von *crumbs* mutanten Augen (Abb. 14, Abb. 24; Pellikka et al., 2002).

Das Wachstum des Auges wird durch eine Aktivierung von Notch entlang der dorso-ventralen Mittellinie gesteuert (Cagan and Ready, 1989; Dominguez and de Celis, 1998; Papayannopoulos et al., 1998). Hierbei kommt es zu einer differentiellen Regulation des Wachstums ventral und dorsal der Mittellinie. Das Wachstum des ventralen Kompartiment wird über die Aktivierung von Notch in den Zellen der dorso-ventralen Mittellinie durch *Fringe* gesteuert (Bruckner et al., 2000; Munro and Freeman, 2000). Die Aktivierung von Notch führt zur Sekretion eines noch unbekanntes Proteins, das über *Lobe* die spezifische Expression von *Serrate* im ventralen Kompartiment reguliert. *Lobe* und *Serrate* sind notwendig für das Wachstum des ventralen Kompartiments (Chern and Choi, 2002). Inwieweit α -Spectrin mit den Molekülen dieses Signalweges interagiert und an der Regulation des Wachstums des ventralen Kompartiments beteiligt ist, wird mit Hilfe der *RNAi*-Konstrukte genauer untersucht. Ein erster direkter Zusammenhang zwischen Molekülen des Notch-Signaltransduktionsweges und *α -spectrin* wurde bei der Oogenese gezeigt (Lopez-Schier and St Johnston, 2002).

4.2.1.2.4 Die Funktion des Spectrin Zytoskeletts bei der Oogenese

Die Analyse von *α -spectrin* und *β_H -spectrin* Mutanten während der Entwicklung des Follikelzellepithels der Ovarian hat distinkte Rollen des Spectrin-Zytoskeletts für die Polarität dieser Zellen gezeigt (Lee et al., 1997; Zarnescu and Thomas, 1999). Der Verlust von *α -spectrin* führt zu einem Verlust der apiko-basalen Polarität; besonders die Organisation der

Diskussion

apikale Domänen der Zellen ist betroffen. Es kommt zu einer Hyperproliferation der posterioren Follikelzellen, die zu einer Auflösung des einschichtiges Epithel führt; die Zellen bilden mehrere, ungeordnete Zellschichten (Lee et al., 1997). Zu einer ähnlichen Störung der Entwicklung eines Zellepithels kommt es in *crumbs* mutanten Embryonen (Tepass et al., 1990). In *α -spectrin* mutanten Follikelzellklonen kommt es zu einem vollständigen Verlust von β_H -Spectrin in der apikalen Domäne, aber nur zu einer Reduktion des basolateralen β -Spectrins (Lee et al., 1997). Mutationen in *β_H -spectrin* führen im Gegensatz zu *α -spectrin* nicht zu einem vollständigen Verlust der apikal-basalen Polarität, obgleich es zu einem Verlust des apikalen α -Spectrins kommt (Zarnescu and Thomas, 1999). Während die Lokalisation von α -Spectrin und β_H -Spectrin immer direkt voneinander abhängt, so ist die basolaterale Verteilung von β -Spectrin zum Teil unabhängig von einer Interaktion mit α -Spectrin. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich die direkte Interaktion von β -Spectrin mit Ankyrin (Lee et al., 1997; Zarnescu and Thomas, 1999; Dubreuil et al., 2000).

Interessanterweise wird die apikale Lokalisierung von α -Spectrin und β_H -Spectrin durch Mutationen der Notch-Aktivatoren *nicastrin* und *presenilin* beeinflusst. In *presenilin* und *nicastrin* mutanten Follikelzellen kommt es zu einem Verlust des apikalen β_H -Spectrins und gleichzeitig zu einer erhöhten apikalen Akkumulation von α -Spectrin (zusammen mit Molekülen der ZA wie DE-Cadherin, Armadillo und α -Catenin) (Lopez-Schier and St Johnston, 2002). Ob die α -Spectrin Verteilung direkt durch diese Moleküle reguliert wird oder ob α -Spectrin am Notch-Signaltransduktionsweges beteiligt ist, werden weitere Arbeiten in der Zukunft zeigen. Die Hyperproliferation der posterioren Follikelzellen in *α -spectrin* Klonen ähnelt jedoch in einigen Aspekten dem Phänotyp einer funktionellen Reduktion eines neurogenen Signalweges (Lee et al., 1997; Ruohola et al., 1991; Xu et al., 1992).

Aufgrund der Funktionen von *α -spectrin* für die Oogenese ist es nicht möglich Keimbahnklone für *α -spectrin* zu generieren, die eine Analyse des kompletten Verlustes von *α -spectrin* während der Embryonalentwicklung erlauben würden. Die Expression der *RNAi*-Konstrukte mit GAL4-Treiberlinien, die schon maternal exprimiert werden (Tracey et al., 2000), sollte eine Reduktion der maternalen *α -spectrin* mRNA ermöglichen, so dass die Funktion dieser *α -spectrin* Komponente in Zukunft genauer analysiert werden kann.

4.2.1.3 Die genomische Organisation der *klötzchen* Region

Die genomische Organisation der beiden Gene *α-spectrin* und *CG32315* legt eine direkte Interaktion zwischen den beiden Genen nahe. Das Vorhandensein eines gemeinsamen, nicht-translatierten ersten Exons bedeutet, dass die Expression und das Spleißen der beiden mRNAs präzise reguliert werden muss. Eine enge genomische Kopplung zwischen zwei Transkripten muss allerdings nicht automatisch zu einer funktionelle Interaktion führen, da für die ähnlich organisierten Gene *par-1* und *echinoid* bislang keine gemeinsame Funktion nachgewiesen wurde (Bai et al., 2001; Shulman et al., 2000).

Im vorliegenden Fall konnte die funktionelle Interaktion der beiden Gene anhand der genetischen Interaktion von *α-spec^{rg41}* mit ektopisch exprimierten wildtypischen und trunkierten Formen des *CG32315* Proteins nachgewiesen werden (Stork, 2002). Die genomische *klötzchen* Region zeigt noch eine weitere Besonderheit. Regulationselemente des Gens *discs lost (dlt)* befinden sich innerhalb des ersten Introns von *α-spectrin/CG32315*, obwohl *dlt* 5 kb proximal kartiert und zusätzlich das Gen *cdc37* zwischen der regulatorischen Region und dem Gen *dlt* liegt (Abb. 6; Bhat et al., 1999). Entgegen der Aussagen von Bhat und Mitarbeitern (Bhat et al., 1999) führen P-Element Insertionen in diesem Bereich zu einer gleichzeitigen Einschränkung der Funktion von *CG32315*, *α-spectrin* und *dlt*. Somit kommt es zu einer genetischen Kopplung von drei Genen, die für die Ausbildung apikale Strukturen notwendig sind; zwei der Proteine (*α-Spectrin* und *Dlt*) interagieren direkt miteinander (Medina et al., 2002).

Eine konservierte Funktion dieser engen räumlichen Anordnung der drei Gene scheint es nicht zu geben, da die einzelnen Gene in anderen Spezies (*Anopheles*, Fisch, Maus, Mensch) nicht gemeinsam angeordnet sind.

4.2.1.4 Kodiert *klötzchen/CG32315* einen Stabilisator der *α-spectrin* mRNA?

Das putative Klötzchen Protein *CG32315* ist ein evolutionär konserviertes Protein. Entsprechende Homologe finden sich sowohl bei *Anopheles Gambiae* als auch beim Menschen. Von *Anopheles* konnte bislang nur ein Proteinfsegment für die Analyse eingesetzt werden, da die Annotation des *Anopheles* Genoms gerade erst begonnen hat. Ob die vorhergesagten Gene die echten Homologe von Klötzchen/*CG32315* sind, kann erst nach einer funktionellen Analyse der jeweiligen Gene bestimmt werden. Das *CG32315* Protein zeigt eine leichte Homologie zu einer Konsensus-Sequenz der *RCC1* (Regulator of

Diskussion

Chromosom Condensation1) Proteine. Klötzchen /CG32315 gehört aber nicht zur Familie der RCC1 Proteine, da in diesen Proteinen die Konsensus-Sequenz 2-5 Mal vorkommt und weitere Domänen konserviert sind (Dasso, 1993).

Aufgrund der Funktion der RCC1 Proteine könnte diese Homologie trotzdem Hinweise über eine mögliche Funktion von CG32315 geben. RCC1 ist der Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für die RanGTPase, die den Import/Export von Proteinen und mRNA in und aus dem Kern kontrolliert (Dasso, 1993; Moore, 2001). RCC1 ist mit dem Chromatin (DNA) im Kern der Zelle assoziiert und kontrolliert den Status des Chromatins zur Regulation des Zellzyklus. Zusätzlich konnte eine direkte Funktion von RCC1 bei der RNA-Reifung, dem RNA-Transport und bei dem mRNA-Export aus dem Kern gezeigt werden (Dasso, 1993). Bisher ist nicht bekannt, welche Sequenzen von RCC1 für die direkte Bindung an DNA notwendig sind. Das bedeutet, dass, obgleich Klötzchen/CG32315 aufgrund der zu geringen Homologie zu RCC1-Proteinen wahrscheinlich kein Aktivator der RanGTPase ist, das konservierte Sequenzmotiv dennoch eine direkte Interaktion von Klötzchen/CG32315 mit Nukleinsäuren (DNA oder mRNA) ermöglichen könnte.

Eine genauere Analyse der konservierten Bereiche des Proteins, insbesondere ein Vergleich mit einem vollständigen Homolog von *Anopheles*, erlaubt möglicherweise die Identifikation weiterer konservierter und somit funktionell bedeutsamer Bereiche des Proteins.

4.2.1.5 Ausblick

Die *RNAi*-Konstrukte von *α -spectrin* und *CG32315* ermöglichen in Zukunft eine detaillierte und zelltypspezifische Analyse der Funktion beider Gene. Von besonderem Interesse ist, ob *CG32315* tatsächlich die *α -spectrin* mRNA Stabilität und somit die *α -Spectrin* Protein Menge beeinflussen kann. Gleichzeitig ermöglichen die *RNAi*-Konstrukte eine weitere Analyse der spezifischen Funktion von *α -spectrin* für die Muskel-, Nervensystem- und Augenentwicklung. Zusammen mit den abschließenden Analysen der genomischen DNA-Sequenz der *klötzchen* Region kann so die Identität und Funktion von *klötzchen* geklärt werden.

4.2.2 Analyse des Gens *kästchen*

Die phänotypische Analyse von *kästchen* hat gezeigt, dass *kästchen* nicht nur für die Trennung der anterioren und posterioren Kommissur benötigt wird, sondern auch eine wichtige Funktion bei weiteren Zell-Zell Interaktionen während der Embryogenese und bei postembryonalen Prozessen übernimmt.

4.2.2.1 Molekulare Charakterisierung von *kästchen*

In meiner Diplomarbeit konnte ich ein P-Element induziertes *kästchen* Allel identifizieren. Die P-Element Insertion *l(3)j8E8* kartiert auf dem linken Arm des dritten Chromosoms im Bereich 66D5-6. Ein erster Kandidat für *kästchen* war das Gen *GST-I*, das für eine Glutation-S-Transferase kodiert (Pielage, 1999). Die Sequenzanalyse des entsprechenden offenen Leserasters in den verschiedenen *kästchen* Allelen und die nicht-mögliche phänotypische Rettung mit einem UAS-*GST-I* Konstrukt zeigte, dass *kästchen* nicht durch *GST-I* kodiert wird.

Die Generierung weiterer P-Element induzierter *kästchen* Allele und die erneute Analyse der genomischen und cDNA-Sequenzen der Region führte zu der Identifizierung des Transkriptes *CG6817*. Die folgenden Befunde zeigen, dass *kästchen* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit durch das Gen *CG6817* kodiert wird.

- (1) Die verschiedenen *kästchen* P-Element induzierten Allele kartieren entweder innerhalb des 5' UTR oder des ersten Introns von *CG6817*. Durch eine Reversionsmutagenese konnte gezeigt werden, dass die Insertion des P-Elements *l(3)j8E8* für die nicht-Komplementation der *kästchen* EMS-Allele verantwortlich ist.
- (2) Zugleich zeigt das β -Galaktosidase Expressionsmusters des P-Elements *l(3)j8E8* große Übereinstimmungen mit dem mRNA Expressionsmusters von *CG6817*. Durch die Insertion kommt es allerdings nur zu einem partiellen Funktionsverlust des Genes.
- (3) Die mRNA Expression von *CG6817* ist besonders in den Geweben detektierbar, die in *kästchen* mutanten Embryonen einen Phänotyp zeigen.
- (4) Das entsprechende *CG6817* Protein konnte spezifisch, in phänotypisch relevanten Geweben nachgewiesen werden. Besonders die starke Expression der Axone des ZNS ist interessant, da Kästchen so direkt die gliale Migration in der ventralen Mittellinie und entlang der longitudinalen Konnektive kontrollieren kann.

Diskussion

- (5) Innerhalb des offenen Leserasters von *CG6817* sind spezifische Basenaustausche in den verschiedenen *kästchen* EMS-Allelen nachweisbar, die zum Austausch konservierter Aminosäuren führen.
- (6) Ein UAS-*CG6817* Konstrukt ermöglicht eine partielle Reversion der *kästchen* Letalität. Die partielle Rettung ist wahrscheinlich auf eine Integration des UAS-*CG6817* Konstruktes in eine transkriptionell stark aktive Region zurückzuführen. Zur Sicherheit muss dieses Experiment noch mit unabhängigen Insertionen und einer gewebsspezifischen Expression wiederholt werden.

Diese 6 Punkte zeigen, dass *kästchen* dem Gen *CG6817* entspricht. Die phänotypische und molekulare Analyse hat gezeigt, dass die beiden Allele *kas^{B1-89}* und *kas^{D3-66}* starke hypomorphe *kästchen* Mutationen sind und die kleine Deletion *kas^{Δ33-4}* wahrscheinlich nur *kästchen* als Letalfaktor betrifft.

4.2.2.2 Die Funktion von *kästchen*

Der Verlust von *kästchen* führt zu vielen unterschiedlichen Phänotypen. Die Untersuchung der zygotischen Mutationen, der Keimbahnklone und der adulten *kästchen* Klone zeigte, dass *kästchen* zwei unterschiedliche Funktionen hat:

kästchen ist für die Determinierung bzw. Differenzierung verschiedener Zelltypen während der Entwicklung notwendig.

kästchen ist an der Kontrolle von Interaktion zwischen Zellen eines Zelltyps und zwischen Zellen unterschiedlicher Zelltypen beteiligt.

Grundlegend für beide Prozesse ist, dass eine Kommunikation zwischen den Zellen stattfindet, die möglicherweise durch *kästchen* kontrolliert wird. Die Analyse verschiedener Signaltransduktionswege in *Drosophila* hat gezeigt, dass Gene, die für die Spezifizierung und Differenzierung von Zellen benötigt werden, später in der Entwicklung häufig an der Kontrolle der Interaktion von Zellen beteiligt sind. So sind sowohl der Notch-, EGF-R-, Dpp- und Wg/Hh-Signaltransduktionsweg an der Spezifizierung von Zellen beteiligt und kontrollieren in späteren Entwicklungsprozessen die Migration, Interaktion oder Fusion von verschiedenen Zelltypen (Bhat, 1999; Sanson, 2001; Kumar, 2001).

4.2.2.2.1 An welchem Signaltransduktionsweg ist *kästchen* beteiligt?

Die eindeutigste Zuordnung von *kästchen* in einen Signaltransduktionsweg ermöglichte die Analyse der *kästchen* Funktion für Entwicklung des adulten Auges. Mit Hilfe der *eyFlp*-Technik konnte eine Beteiligung von *kästchen* an drei unterschiedlichen Prozessen nachgewiesen werden. Der auffälligste Phänotyp ist, dass in *kästchen* mutanten Augen die Wanderung der morphogenetischen Furche gestört ist, die für die Determinierung der Photorezeptoren benötigt wird. Als Resultat kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Differenzierung des Auges und einer Verkleinerung des Auges in der anterior-posterioren Achse.

Verantwortlich für die Fortbewegung der morphogenetischen Furche und die Initiierung der Musterbildung innerhalb der Augenimaginalscheibe ist das sekretierte Protein Hedgehog (Hh) (Ma et al., 1993; Heberlein et al., 1993; Heberlein et al., 1995, Dominguez and Hafen, 1997; Borod and Heberlein, 1998; Greenwood and Struhl, 1999). In frühen Larvalstadien ist Hh in den posterioren Bereichen der Augenscheibe exprimiert und initiiert von dort die morphogenetische Furche, die anschließend über die Augenscheibe wandert (Ready et al., 1976). Dabei kommt es zu einer kontinuierlichen Sekretion von Hh von den differenzierenden Photorezeptorzellen zu den undifferenzierten Zellen anterior der Furche. Diese Zellen teilen sich ein letztes Mal, werden Teil der morphogenetischen Furche und beginnen sich in Photorezeptorzellen zu differenzieren. Dieser kontinuierliche Zyklus sorgt für die gleichmäßige Wanderung der Furche über das retinale Epithel (Heberlein and Moses, 1995).

Eine Reduktion des Auges in der anterior-posterioren Achse ist sowohl bei homozygot mutanten Fliegen des augenspezifischen *hh*-Allels *hh^{bar3}* (Synonym *hh^l*) (Heberlein et al., 1993) als auch bei *eyFlp* induzierten *kästchen* Augenklonen zu beobachten. Reduziert man im Hintergrund der *hh^{bar3}*-Fliegen die *kästchen* Dosis, so kommt es zu einer sichtbaren Verstärkung des Phänotyps. Die Differenzierung der Ommatidien stoppt noch früher. Diese dosisabhängige Interaktion (die Fliegen besitzen noch eine wildtypische *kästchen* Kopie) zeigt, dass *kästchen* sehr wahrscheinlich direkt für eine Aktivierung der *Hh*-abhängigen Prozesse benötigt wird.

4.2.2.2.2 *kästchen* und *hedgehog* kontrollieren die Migration von Gliazellen

Neben der Steuerung der Differenzierung der Photorezeptorzellen wird *kästchen* auch für die Kontrolle der Migration der Gliazellen in die Augenscheibe benötigt. Die Gliazellen

Diskussion

wandern im zweiten Larvalstadium nach dem Beginn der Photorezeptor-Differenzierung aus dem optischen Stiel in die Augenscheibe (Choi and Benzer, 1994).

Auch dieser Prozess wird maßgeblich durch *hedgehog* kontrolliert. *hh* wird zusammen mit den Augenspezifizierungsgenen *eyeless (ey)*, *sine oculis (so)* und der Casein Kinase *gilgamesh (gish)* in der posterioren Region der Augenscheibe exprimiert und verhindert die vorzeitige Migration der Gliazellen in die Augenscheibe (Hummel et al., 2002). Die Migration der Gliazellen wird erst durch ein Signal der Photorezeptoren ermöglicht, das die Repulsion des Signalkomplexes aus Ey, So, Hh und Gish aufhebt. Die Gliazellen wandern allerdings nie weiter als bis zu der ersten Reihe der neuformierten Photorezeptorzellen posterior der morphogenetischen Furche (Abb. 34; Rangarajan et al., 1999; Hummel et al., 2002). Für die Aufrechterhaltung der virtuellen Grenze der Gliazellen posterior der ersten Photorezeptoren ist *hh* nicht verantwortlich, da die Gliazellen in *hh^{bar3}* Fliegen diese Grenze respektieren (Hummel et al., 2002).

Obgleich Hh der aussichtsreichste Kandidat für das repulsive Signalmolekül ist, dass die Migration der Gliazellen in die Augenimaginalscheibe kontrolliert, ist die Signalübertragung bisher ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass ein mögliches *Hh*-Signal nicht über den klassischen Hh-Signaltransduktionsweg in den Gliazellen aufgenommen wird. Mutationen der Hh-Inhibitoren oder -Aktivatoren in den Gliazellen, wie *patched*, *smoothened* oder *cubitus interruptus (ci)* haben keinerlei Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der Gliazellen (Hummel et al., 2002).

In diesem Zusammenhang ist die Rolle von *kästchen* für die Kontrolle der Gliamigration besonders interessant. Als Transmembranprotein kann Kästchen direkt an der Zell-Zell Kommunikation zwischen dem Signalkomplex der Augenimaginalscheiben-Epithelzellen und den Gliazellen im optischen Stiel beteiligt sein. Zugleich könnte Kästchen auch später als Signal der Photorezeptor-Axone für die Aufrechterhaltung der anterioren Grenze der Gliazellen dienen. Alternativ kann *kästchen* auch direkt für die Aktivierung von Hh zuständig sein oder in einem neuen Hh-Signaltransduktionsweg an der Expression eines repulsiven Signals beteiligt sein. Zur Klärung dieser Fragen, werden momentan die Interaktion von *kästchen* mit den anderen Genen des Signalkomplexes und die Expression bzw. Proteinverteilung von Kästchen in der Augenimaginalscheibe und in den Gliazellen genauer untersucht.

4.2.2.2.3 Die Funktion von *kästchen* bei der Kopfentwicklung

Die Analyse der *eyFlp*-Klone hat eine weitere, wichtige Rolle von *kästchen* für die Entwicklung der Derivate der Augenimaginalscheibe gezeigt. Der Verlust von *kästchen* führt, bei entsprechender Klonegröße, zu einem Verlust aller sensorischen Organe des dorsalen Kopfes, die durch einfache Kutikula ersetzt werden. Bei dem starken Allel *kas^{B1-89}* kommt es zusätzlich zu einer deutlichen Reduzierung des Abstandes zwischen den beiden Komplexaugen. Die Strukturierung der dorsalen Kopfregion wird durch die Expression von *hh* im medianen Bereich des Kopfes, dem Bereich der Ocelli kontrolliert (Amin et al., 1999). *hh* aktiviert über *ci* die Expression von *engrailed* und des EGF-Rezeptor Liganden *vein* in der interocellar Region (Royet and Finkelstein, 1996; Amin et al., 1999). Der Verlust von *hh* führt zu einem Verlust der Ocelli und eines Großteils der dorsalen Borsten. Nicht betroffen, zumindest bei Verwendung des temperatursensitiven Allels *hh^{ts2}*, sind die orbitalen Borsten, die über den Wingless-Signalweg spezifiziert werden (Royet and Finkelstein, 1996; Amin et al., 1999).

Die beobachteten *kästchen* Phänotypen legen wiederum eine Funktion von *kästchen* im Hh-Signaltransduktionsweg nahe. Da der Verlust von *kästchen* aber zu einem stärkeren Phänotyp als der Verlust von *hh* (zumindest bei Verwendung des *hh^{ts2}*-Allels) führt, ist *kästchen* möglicherweise noch an anderen Signaltransduktionswegen beteiligt. Der teilweise Verlust der Orbital-Borsten deutet auf eine Beteiligung im Wingless-Signaltransduktionsweg hin, die aufgrund der engen Kopplung des Hh/Wg-Funktionen in den meisten Geweben plausibel erscheint (Hidalgo, 1991; Ingham and Hidalgo, 1993; Ingham and McMahon, 2001; Bhat, 1999; Sanson, 2001). Besonders die *kästchen* Flügelklone, in denen es zu einem Verlust des Flügelrandes kommt, deuten auf eine solche Funktion hin (Zecca et al., 1996; Neumann and Cohen, 1997; Glise et al., 2002).

Die postembryonale Analyse der *kästchen* Funktion hat gezeigt, dass beide *kästchen* Funktionen, die Determinierung von Zellen und die direkte Interaktion zwischen differenzierten Zellen, zumindest zum Teil über den Hh-Signaltransduktionsweg vermittelt werden. *kästchen* wird wahrscheinlich an der Aktivierung oder Vermittlung des Hh-Signals beteiligt.

4.2.2.2.4 Die Funktion von *kästchen* im ZNS

Die Beurteilung der Funktion von *kästchen* für die Entwicklung des embryonalen Nervensystems wird durch die Beteiligung der maternale Komponente an dem Prozess

Diskussion

erschwert. Die Analyse der Keimbahnklone hat gezeigt, dass die somatische Entwicklung von Embryonen, denen die maternale Komponente von *kästchen* fehlt, durch das Vorhandensein einer paternalen wildtypischen Kopie von *kästchen* gerettet werden kann. Es kommt jedoch zu einer deutlichen Verstärkung des *kästchen* Phänotyps, wenn sowohl die maternale als auch die zygotische *kästchen* Funktion fehlt. Ähnliche Befunde wurden für Mitglieder des Hh-Signalweges wie z. B. *smoothened* (*smo*) gezeigt (Van den Heuvel and Ingham, 1996).

Da nur mit der hypomorphen *kästchen* Mutation *kas*⁰¹⁻⁴¹ eine ausreichende Anzahl maternal und zygotisch mutanter Embryonen erzeugt werden konnte, ist eine eindeutige Aussage über die Funktion von *kästchen* nicht möglich. Auffällig ist, dass es häufig zu einem Verlust kompletter Segmente bzw. der Segmentpolarität kommt. Besonders die neuronalen Phänotypen ähneln in vielen Aspekten den Phänotypen von *wingless* oder *hedgehog* Mutationen (Hummel et al., 1999a).

Betrachtet man ausschließlich die Phänotypen, die durch den Verlust der zygotischen *kästchen* Komponente zustande kommen, so ist die Korrelation mit *wg*- bzw. *hh*-Funktionen etwas einfacher. Interessant ist in diesem Zusammenhang besonders das Expressionsmusters der Enhancer-Trap Insertion *kas*^{l(3)j8E8}. Die Analyse der β -Galaktosidase Expression zeigt eine erhöhte Expression von *kästchen* in 4 Zellen entlang der Mittellinie und einem Cluster von Zellen (u.a. eventuell Motoneurone) im lateralen Bereich des ZNS. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in *kästchen* mutanten Embryonen eine Fehlspezifizierung der Nachkommen des lateralen Neuroblasten 6-4 und eine Veränderung des Expressionsmusters von Zellen entlang der Mittellinie beobachtet werden (J. Urban, pers. Mitteilung).

Für die Entwicklung des NB 6-4 konnte eine direkte Funktion von *wingless* und *hedgehog* demonstriert werden (Chu-LaGraff and Doe, 1993; Matsuzaki and Saigo, 1996; Deshpande et al., 2001). Obgleich die Rolle von *hh* noch kontrovers diskutiert wird, so scheint dennoch die Hauptaufgabe von *hh* und *wingless* die Aufrechterhaltung der *engrailed* Expression zu sein, die notwendig für die Formierung und Spezifizierung des Neuroblasten ist (Chu-LaGraff and Doe, 1993; Lundell et al., 1996; Matsuzaki and Saigo, 1996; Hidalgo and Ingham, 1990; Deshpande et al., 2001). Die beobachteten *kästchen* Phänotypen, der Verlust von Motoneuronen und ML-Gliazellen, könnte zumindest teilweise durch eine Störung des Wg/Hh-Signalweges zustande kommen (Hummel et al., 1999a).

Alternativ oder auch zusätzlich kann *kästchen* direkt an der Kommunikation der Neuronen und Gliazellen während der glialen Migration beteiligt sein. Dieses Modell wird

Diskussion

besonders durch die Expression des Kästchen Proteins auf den Axonen der Kommissuren und Konnektive unterstützt und stände in Einklang mit der beobachteten Funktion von *kästchen* bei der Kontrolle der glialen Migration im Auge.

4.2.2.2.5 Die Funktion von *kästchen* bei der Keimzellmigration

In *kästchen* mutanten Embryonen ist der letzte Schritt der Keimzellmigration, die Koaleszenz des Gonaden-Mesoderms mit den Keimzellen gestört. Die Keimzellen werden nicht mehr zu einer kompakten Gonade zusammengeführt, sondern verteilen sich entlang der anterior-posterioren Achse. Dieser Phänotyp ist bisher nur für Mutationen eines weiteren Gens beschrieben worden, *fear-of-intimacy (foi)*, das in einer großen Mutagenese anhand des Keimzellphänotyps identifiziert wurde (Moore et al., 1998). Laut Datenbankeinträgen (www.fruitfly.org) soll *foi* ebenso wie *kästchen* dem Gen *CG6817* entsprechen. Die Klonierung des Gens ist aber bislang noch nicht von der publiziert worden. Die nahezu identischen Phänotypen von *kästchen* und *foi* bezüglich der Gonadenkoaleszenz und die übereinstimmende Kartierung der beiden Gene legen nahe, dass beide Mutationen das gleiche Gen betreffen. Eine entsprechende Komplementationsanalyse steht noch aus.

Wiederum übt *hh* eine prominente Rolle bei mehreren Schritten der Keimzellmigration aus. Die genaue Betrachtung der *hh*-assoziierten Phänotypen zeigt, dass *hh* auch an der Kompaktierung der Gonade beteiligt sein könnte (Moore et al., 1998; Deshpande et al., 2001). Da *hh* an der Spezifizierung des Gonadenmesoderms beteiligt ist, nahmen R. Lehmann und Mitarbeiter an, dass ausschließlich diese frühe Funktion für die Entstehung des *hh*-Keimzellphänotyps verantwortlich ist (Moore et al., 1998). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass *hh* zusätzlich für die Attraktion der Keimzellen zum Gonaden-Mesoderm verantwortlich ist (Deshpande et al., 2001). Nach der Migration der Keimzellen durch das Epithel des posterioren Darmprimordiums müssen die Keimzellen direkt zu den Zellen des Gonaden-Mesoderms geleitet werden, mit denen sie bis zur Gonadenkoaleszenz assoziiert bleiben. Sowohl repulsive als auch attraktive Signale vermitteln diesen Prozess. Für die Repulsion der Zellen weg von somatischen Zellen außer dem Gonaden-Mesoderm sorgt ein Signal, das durch die beiden *wunen* Gene vermittelt wird (Zhang et al., 1997; Starz-Gaiano et al., 2001). Für die Attraktion zum Gonaden-Mesoderm ist eine HMG-CoA Reduktase (*columbus*) und *hh* zuständig (van Doren et al., 1998, Deshpande et al., 2001).

Besonders interessant ist, dass die Aktivierung des Hh-Signalweges durch Mutationen der Hh-Inhibitoren *patched* oder *PKA* zu einer vorzeitigen Kompaktierung der Keimzellen

Diskussion

führt (Deshpande et al., 2001). Übereinstimmend hiermit führt die Inaktivierung des Hh-Signals durch Mutationen in *smo* und *fused* zu einer Dissoziation der Keimzellen von den Zellen des Gonadenmesoderms (Deshpande et al., 2001).

Bezieht man diese Befunde auf den *kästchen* Phänotyp, so könnte es bedeuten, dass in *kästchen* mutanten Embryonen der Hh-Signalweg erst nach der initialen Assoziation der Keimzellen mit dem Gonadenmesoderm gestört ist und es so nicht zu der Kompaktierung der Gonade kommt. Das Hh-Signal würde für drei aufeinanderfolgende Prozesse bei der Keimzellmigration bzw. der Interaktion zwischen den Keimzellen und den Zellen des Gonadenmesoderms benötigt und zumindest der letzte Schritt wird spezifisch durch *kästchen* vermittelt. Die Analyse der Keimzellmigration in *kästchen* Keimbahnklonen könnte Hinweise über eine Funktion von *kästchen* auch bei den früheren Hh-abhängigen Prozessen geben.

Möglicherweise sind die gleichen Mechanismen, die für die Koaleszenz der Gonade zuständig sind, für die Kompaktierung der neuronalen Cluster im peripheren Nervensystem zuständig. Kästchen könnte eine einheitliche Rolle bei der Vermittlung von engen Zell-Zell-Interaktionen haben, die auch für die Trennung der Kommissuren durch die ML-Gliazellen notwendig sind.

4.2.2.3 Das Kästchen Protein

kästchen kodiert für ein 701 Aminosäuren großes Protein. Mit Hilfe des Protein-Analyse Programms Smart wurde versucht die Topologie des Proteins vorherzusagen. Ein Modell des Proteins ist in Abb. 54 dargestellt. Kästchen ist ein Typ I Transmembranprotein mit 6 Transmembrandomänen, einem extrazellulären N-Terminus und einem langen intrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4. Homologe des Proteins finden sich sowohl bei *Anopheles*, der Maus und dem Menschen. Die einzelnen Transmembrandomänen und der intrazelluläre Loop sind die am höchsten konservierten Bereiche des Proteins. Der C-terminale Bereich (Aminosäuren 531-676) zeigt Homologien zu einer sogenannten Zip-Domäne, die in Zink-Transporter Proteinen bei der Hefe, *Arabidopsis* und dem Menschen vorhanden ist (MacDiarmid et al., 2000; Grotz et al., 1998). Diese charakterisierten Zink-Transporter zeigen allerdings eine deutliche geringere Homologie zu Kästchen als andere, vornehmlich noch nicht molekular charakterisierte Proteine.

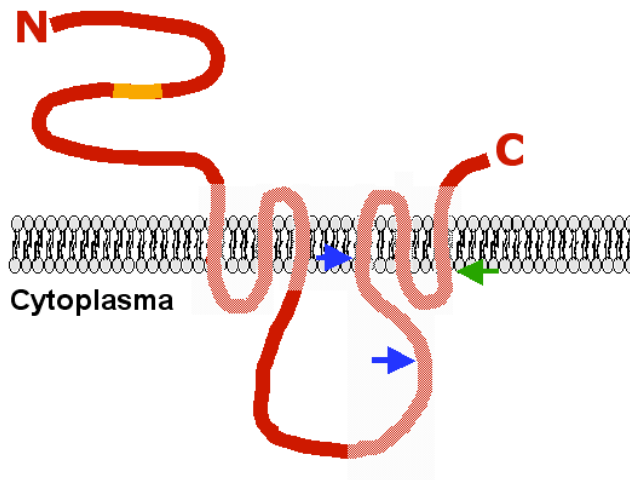


Abb. 54 Die Topologie des Kästchen Proteins.

Der N- und C-Terminus des Kästchen Proteins befinden sich nach Computervorhersagen außerhalb der Zelle bzw. im ER-Lumen. Die stark konservierten Bereiche des Proteins sind schraffiert dargestellt. Die Pfeile markieren die Positionen der einzelnen Aminosäure-Austausche in der *kästchen* Mutationen *kas^{B1-89}* (grün) und *kas^{D3-66}* (blau). Die Peptidsequenz, die zur Antikörper-Generierung eingesetzt wurde ist gelb gekennzeichnet.

Von den charakterisierten homologen Proteine zeigt das Maus Ermelin Protein sowohl hinsichtlich der Sequenzidentität als auch hinsichtlich der vorhergesagten Topologie, die größte Übereinstimmung mit Kästchen (Suzuki and Endo, 2002). Eine größere Identität wurde nur bei dem menschlichen und dem *Anopheles* Homolog gefunden, die für den Sequenzvergleich herangezogen wurden. Die bisherige Charakterisierung von Ermelin bezieht sich ausschließlich auf die Expression und einen Sequenzvergleich des Proteins. Ermelin ist hauptsächlich im Gehirn und den Hoden exprimiert (Suzuki and Endo, 2002), also zwei Geweben die eine entsprechende Expression von *kästchen* in *Drosophila* zeigen. Gemeinsam mit Ermelin besitzt Kästchen einen stark konservierten Proteinabschnitt von etwa 60 Aminosäuren, eine sogenannte HELP-Domäne. Die Domäne befindet sich bei Kästchen und bei Ermelin im Bereich des intrazellulären Loops zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4.

In den Datenbanken findet sich eine große Anzahl Proteine, die eine solche Domäne besitzen. Über die Funktion dieser Domäne machen die Autoren keine Aussage, interessant ist aber, dass die hochkonservierte HELP-Domäne Übereinstimmungen mit dem aktiven Zentrum der Zink-Protease Site-2 Protease (S2P) zeigt (HEXXH) (Rawson et al., 1997; Brown and Goldstein, 1999; Rudner et al., 1999). Die S2P ist eine Metalloprotease, die eine Proteolyse innerhalb der Transmembrandomänen der Substrate vermittelt. Da die HELP-Domäne selbst einen stark hydrophoben Charakter hat, ist es möglich, dass sich die Domäne nicht im Zytoplasma sondern innerhalb der Membran befindet. Zusammen mit der Ähnlichkeit zu den Zink-Transportern ist es möglich, dass Kästchen eine intramembranöse Metalloprotease ist. Allerdings findet man normalerweise keinen Prolinrest zwischen den beiden Histidinen (HELPH), die das Zink binden würden, da Proline die Bildung α -helikaler

Diskussion

Strukturen nicht unterstützen. Unterstützt wird die Hypothese durch den Befund, dass das Ermelin Proteins ebenso wie die S2-Protease im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Susuki and Endo, 2002; Rudner et al., 1999).

Als Protease könnte Kästchen ähnlich wie Rhomboid oder Presenilin in *Drosophila* für die Aktivierung von verschiedenen Signalmolekülen zuständig sein (Urban and Freeman, 2002). Alternativ könnte Kästchen, als Transmembranprotein, auch direkt an der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen beteiligt sein, zumal eine Lokalisation auf den Axonen des ZNS gezeigt werden konnte.

4.2.2.4 Ausblick

Zur Klärung der genauen Funktion von *kästchen* bei der Kontrolle der glialen Migration, der Kompaktierung der Gonade und bei der Determinierung verschiedener Zelltypen muss besonders die Zellautonomie von *kästchen* geklärt werden, um Aussagen über eine mögliche Funktion als Signal oder Rezeptor machen zu können. Die Aufklärung der subzellulären Lokalisation des Proteins und die Analyse genetischer Interaktionen mit weiteren Molekülen verschiedener Signaltransduktionswege werden helfen, die genaue Funktion von *kästchen* zu klären.

4.2.3 Analyse des Gens *schmalspur*

Im Gegensatz zu *klötzchen* und *kästchen* kommt der fusionierte Kommissurenphänotyp in *schmalspur* mutanten Embryonen nicht primär durch eine Störung der Interaktion zwischen ML-Neuronen und ML-Gliazellen zustande, sondern durch eine Beeinträchtigung der Interaktion der Mittellinienzellen mit den longitudinalen Axonen und Gliazellen. Möglicherweise aufgrund eines partiellen Funktionsverlustes des repulsiven Signalweges werden die longitudinalen Axone näher an der Mittellinie positioniert, so dass die Kommissuren fusioniert wirken. Die phänotypische und funktionelle Analyse von *schmalspur* hat gezeigt, dass *schmalspur*, neben der Kontrolle der Repulsion im ZNS, eine wichtige Funktion bei der Augenentwicklung von *Drosophila* übernimmt.

4.2.3.1 Die molekulare Charakterisierung von *schmalspur*

Den Einstieg in die molekulare Identifizierung von *schmalspur* ermöglichte das P-Element *EP(3)0304*, das eine genetische Interaktion mit den *schmalspur* EMS-Allelen zeigt. Das P-Element ist innerhalb des 5' UTR des Gens *CG13928* inseriert und führt in

Diskussion

Transheterozygose zu den *schmalspur* EMS-Allelen zu einem leichten rauhen Augenphänotyp. Ausgehend von diesem P-Element konnte durch eine Reversionsmutagenese eine große Anzahl von „jump out“ Allelen generiert werden, die *schmalspur* nicht komplementieren bzw. eine starke genetische Interaktion mit den *schmalspur* EMS-Allelen zeigen. Viele dieser „jump out“ Allele sind P-Element interne Deletionen, die möglicherweise unterschiedlich stark die Expression von *CG13928* betreffen, da sie anhand ihrer Letalitätsphase in vier unterschiedliche phänotypische Klassen eingeordnet werden konnten.

Die genetische Analyse von *schmalspur* wird durch eine komplexe genomische Organisation erschwert (Abb. 42). Das Gen *CG13928* liegt innerhalb des Introns eines Gens, das für eine γ -Glutamyl-Carboxylase (*CG*) kodiert (Li et al., 2000; Walker et al., 2001). Durch eine gerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass das Gen *CG* nicht essentiell für die Entwicklung von *Drosophila* ist (Rong et al., 2002). *schmalspur* entspricht somit nicht *CG*. Proximal von *CG13928* liegt das Gen *neuronal-synaptobrevin* (*n-syb*), das für ein synaptisches v-SNARE Protein kodiert (Deitcher et al., 1998). Während viele der *schmalspur* „jump out“ Allele die *n-syb* Mutationen nicht komplementieren, sind alle *schmalspur* EMS-Allele vital in Transheterozygose zu den beiden molekular definierten *n-syb* Allelen. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass *schmalspur* *n-syb* entspricht.

Eine Reversion des *schmalspur* Phänotyps oder der *schmalspur* Letalität durch eine Expression des UAS-*CG13928* Konstruktes im Hintergrund der *schmalspur* Mutationen war bisher noch nicht erfolgreich. Die Rettung mutanter Phänotypen oder der Letalität von Mutationen mit dem GAL4/UAS-System hängt von zwei wesentlichen Faktoren ab. Das GAL4-Expressionsmuster muß möglichst exakt mit dem endogenen Expressionsmuster des betroffenen Gens übereinstimmen und zugleich muß die ektopische Expression mit der endogenen Expressionsstärke übereinstimmen. Die Analyse des mRNA Expressionsmusters hat gezeigt, dass das Gen *CG13928* sehr stark und dynamisch während der Embryogenese exprimiert wird. Die ektopische Expression von *CG13928* führt zu dosissensitiven Effekten in den entsprechenden Geweben, so kommt es z. B. im Auge zu einer Phänokopie des *schmalspur* Verlustphänotyps. Eine Reversion des *schmalspur* Phänotyps ist aus diesen Gründen relativ kompliziert, da keine GAL4-Treiberlinie zur Verfügung steht, die dem endogenen Expressionsmuster von *CG13928* annähernd entspricht.

Die Sequenzanalyse des offenen Leserasters von *CG13928* in den verschiedenen *schmalspur* Allelen wurde gerade erst begonnen. Bei dem ersten, untersuchten *schmalspur* Allel *sur*^{D4-19} kommt es zu keinen signifikanten Basenaustauschen. Da aber auch die „jump

Diskussion

out“ Allele wahrscheinlich die Regulation der Transkription von *CG13928* betreffen, ist es möglich, dass es sich bei *sur^{D4-19}* um eine regulatorische Mutation handelt. Die Analyse der beiden Allele *sur^{D1-38}* und *sur^{D3-69}* steht noch aus.

Zusammengenommen ist es sehr wahrscheinlich, dass *schmalspur* durch das Gen *CG13928* kodiert wird. Die Isolierung der kleinen Defizienz *sur^{304out4}* ermöglichte die Analyse des kompletten Verlustes von *schmalspur* und zeigte, dass es sich bei den *schmalspur* EMS-Allelen nur um hypomorphe Mutationen von *schmalspur* handelt.

4.2.3.2 Die Funktion von *schmalspur* im zentralen Nervensystem

Das Gen *CG13928/schmalspur* ist am stärksten im embryonalen Nervensystem und in der Augenheimnisscheibe von *Drosophila* exprimiert. Übereinstimmend kommt es in *schmalspur* mutanten Embryonen und Klonen zu einer starken Beeinträchtigung der Entwicklung des Nervensystems und des adulten Auges.

Die beobachteten embryonalen Phänotypen zeigen eine Funktion von *schmalspur* bei der Kontrolle der Repulsion von ventrolateralen Zellen durch die ventralen Mittellinie. Für drei unterschiedliche Zelltypen konnte ein qualitativ gleicher Phänotyp nachgewiesen werden. Die medianen Fasciclin II-positiven Axone der longitudinalen Konnektive sind nicht mehr voneinander getrennt, sondern berühren sich entlang der ventralen Mittellinie. Diese Kontakte kommen besonders im Bereich der Kommissuren zustande. Analog kommt es zu einer Annäherung der lateralen Gliazellen an die Mittellinie, die ebenfalls besonders im Bereich der Kommissuren zu beobachten ist. Gleichzeitig kommt es zu einer leichten Reduktion der Axontrakte und der Anzahl der Gliazellen im Bereich zwischen den Kommissuren. Neben der Repulsion der Neurone und Gliazellen ist die ZNS-Mittellinie auch für die Positionierung der ventralen Muskelansatzstellen verantwortlich. In *schmalspur* mutanten Embryonen sind die Ansatzstellen, im Gegensatz zum Wildtyp, an der ventralen Mittellinie angeordnet. Für alle drei Zelltypen konnte eine deutliche Verschiebung zur ventralen Mittellinie beobachtet werden, es kommt aber nicht zu einem Überschreiten oder Kreuzen der Mittellinie.

Verantwortlich für die Positionierung der longitudinalen Axone, Gliazellen und Muskelansatzstellen ist der repulsive Robo/Slit-Signalweg (Kidd et al., 1999; ; Simpson et al., 2000a; Simpson et al., 2000b; Rajagopalan et al., 2000a; Rajagopalan et al., 2000b). Der repulsive Ligand Slit wird innerhalb des ZNS ausschließlich von den ML-Gliazellen exprimiert (Rothberg et al., 1990). Die ZNS-Neurone exprimieren ein unterschiedliche Kombinationen der Robo-Rezeptoren (Robo, Robo2 und Robo3), die für die Positionierung

Diskussion

der longitudinalen Axone innerhalb der Konnektive verantwortlich sind (Simpson et al., 2000b; Rajagopalan et al., 2000b). Im Gegensatz zu Mutationen in *robo* oder *slit* kommt es in *schmalspur* mutanten Embryonen nicht zu einem Kreuzen der Mittellinie durch longitudinale Axone.

Die Sortierung der drei Fasciclin II-positiven Faszikel ist in *schmalspur* mutanten Embryonen nicht auffällig gestört; *schmalspur* scheint keinen Einfluß auf den Robo-Kode zu haben. Zugleich ist die beobachtete ventrale Verschiebung der Muskelansatzstellen in *schmalspur* Mutanten deutlich stärker als bei *robo* oder *robo/robo3* Mutationen, aber deutlich schwächer als in *slit* oder *robo/robo2* Einzel- bzw. Doppelmutanten (Rajagopalan et al., 2000a).

Die wahrscheinlichste Erklärung für den *schmalspur* Phänotyp ist eine Reduktion des repulsiven Slit-Signals in den ML-Gliazellen. Diese Reduktion des Slit-Signals kann durch eine Störung der Differenzierung der ML-Gliazellen zustande kommen. Übereinstimmend hiermit ähnelt der *schmalspur* Phänotyp dem ZNS-Phänotyp von Mutationen des EGF-Rezeptor Signaltransduktionsweg, der für die Differenzierung und Funktion der ML-Gliazellen notwendig ist (Klaes et al., 1994; Scholz et al., 1997; Stermerdink and Jacobs, 1997; Lanoue and Jacobs, 1999; Hummel et al., 1999a). Eine Beeinträchtigung der Differenzierung der ML-Gliazellen würde sowohl die Positionierung der longitudinalen Axone als auch die Trennung der Kommissuren betreffen und so die beobachteten *schmalspur* Phänotypen gut erklären.

4.2.3.3 Die Funktion von *schmalspur* bei der Augenentwicklung

Die Analyse der postembryonalen Funktionen von *schmalspur* hat gezeigt, dass *schmalspur* für die Entstehung des adulten Auges notwendig ist. Erzeugt man *schmalspur* mutante Augenklone, die nahezu die gesamte Augenimaginalscheibe betreffen, so kommt es zu einem kompletten Verlust des mutanten Gewebes, die Augen bestehen nur noch aus wenigen heterozygoten Zellen. Auch bei kleinen *schmalspur* mutanten Augenklone kommt es zu einem Verlust der klonalen Zellen, die offensichtlich einen Entwicklungsnachteil gegenüber den heterozygoten Zellen haben. Die Analyse der hypomorphen *schmalspur* „jump out“ Allele hat gezeigt, dass *schmalspur* für die Entwicklung der Augen benötigt wird, da es hier zu einer deutlichen Reduktion der Augengröße kommt.

Für die Entwicklung des Auges sind primär 7 Augenspezifizierungsgene verantwortlich. Der Verlust der 7 kernständigen Faktoren Eyeless, Twin of eyeless, Sine oculis, Eyes absent,

Diskussion

Dachshund, Eye gone und Optix führt zu einer Reduktion oder dem vollständigen Verlust des adulten Auges (Hunt, 1971; Bonini et al., 1993; Cheyette et al., 1994; Mardon et al., 1994; Quiring et al., 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994; Hazelett et al., 1998; Czerny et al., 1999, Seimiya and Gehring, 2000). Gleichzeitig führt die ektopische Expression dieser Gene (außer *sine oculis*) zu einer Induktion retinaler Entwicklung außerhalb des normalen Augengewebes (Bonini et al., 1997, Halder et al., 1995; Shen and Mardon, 1997, Czerny et al., 1999, Seimiya and Gehring, 2000). Die Gene werden nicht in einer linearen Abfolge benötigt, sondern wirken als komplexes Netzwerk (Hazelett et al., 1998; Czerny et al., 1999; Halder et al., 1998). Zusätzlich zu diesen Master-Regulator Genen kontrollieren der EGF-Rezeptor Signalweg und der Notch-Signalweg die Regulation der Augenspezifizierung (Hsiao et al., 2001; Kumar and Moses, 2001a; Kumar and Moses, 2001b; Kurata et al., 2000). Aufgrund der bisherigen Befunde ist eine eindeutige Einordnung von *schmalspur* in diese Signalwege noch nicht möglich. Es werden weitere klonale Analysen und Interaktionsstudien mit den jeweiligen Mutationen durchgeführt, um die Funktion von *schmalspur* für die Augenentwicklung zu klären.

4.2.3.4 Das Schmalspur Protein

Die Analyse der Aminosäuresequenz des Schmalspur Proteins hat gezeigt, dass Schmalspur eine konservierte Domäne besitzt. Im N-terminalen Bereich des 245 Aminosäuren großen Proteins befindet sich eine PHD (Plant Homeo Domain)-Domäne (Aasland et al., 1995). Das charakteristische Sequenzmuster ist ein konserviertes Cys₄-His-Cys₃ (C₃HC₄) Zink-Bindungs Motiv. Die Domäne faltet sich in einen Zink-Finger, der zwei Zink²⁺-Ionen in einer ähnlichen Weise wie die RING-Domänen bindet (Pascual et al., 2000; Capili et al., 2001). Die PHD-Domäne ermöglicht in den bisher charakterisierten eukaryotischen Proteinen Protein-Protein Interaktionen mit Faktoren, die an der Kontrolle der Chromatin-vermittelten Regulation der Transkription beteiligt sind (Capili et al., 2001). Für das Schmalspur Protein findet sich in den Datenbanken kein eindeutiges Homolog beim Menschen oder in anderen Spezies. Die PHD-Domäne zeigt die höchste Übereinstimmung mit der PHD-Domäne des *Drosophila* Pygopus Proteins, das an der Kontrolle des Wingless-Signalweges beteiligt ist (Parker et al., 2002).

In *Drosophila* finden sich PHD-Domänen auch bei Polycomb-like und Trithorax Proteinen, die als Repressoren direkt an der Kontrolle der Transkription beteiligt sind (Aasland et al., 1995). Eine Funktion im Nervensystem ist bisher nur für das PHD-Domänen

Diskussion

Protein Dalf nachgewiesen worden. *Dalf* wird ähnlich wie *schmalspur* im gesamten ZNS exprimiert und kontrolliert die Expression von *even-skipped (eve)* in bestimmten Motoneuronen (Bahri et al., 2001). Interessanterweise kommt es bei *Dalf* mutanten Tieren zu einer Störung des larvalen Wachstums und die Tiere sterben nach einigen Tagen als L1-Larven. Dieser Phänotyp ist ebenfalls bei einer Klasse der *schmalspur* „jump out“ Allele zu beobachten (Tabelle 5). *schmalspur* wird aber nicht für die Kontrolle der *eve* Expression in Motoneuronen benötigt (Daten nicht gezeigt).

4.2.3.5 Die Auswirkungen der ektopischen Expression von *schmalspur*

Die ektopische Expression von *schmalspur* führt zu ähnlichen Phänotypen wie der Verlust von *schmalspur*. Die Expression von *schmalspur* mit *ey-GAL4* führt zu einem kompletten Verlust des adulten Auges. Für diesen Befund kann es zwei Gründe geben:

(A) Die Entwicklung des Auges ist abhängig von der präzisen Einhaltung der *schmalspur* Dosis, so dass sowohl der Verlust von *schmalspur* als auch eine Erhöhung der *schmalspur* Expression die Bildung des Auges beeinträchtigt. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine geringer Expression des UAS-Konstruktes zu einem milderem Phänotyp führt (Abb. 53).

(B) Das ektopisch exprimierte Schmalspur Protein interagiert unspezifisch mit den Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung des Auges kontrollieren, so dass die Regulation der Augenentwicklung gestört wird. Eine solche, unspezifische Interaktion konnte für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren gezeigt werden (Jiao et al., 2001). Der Phänotyp kommt durch eine Inhibition der Proliferation zustande, die durch eine simultane Expression von *Cyclin E* in den meisten Fällen abgeschwächt werden kann (Jiao et al., 2001). In der Tat läßt sich auch der *ey-GAL4/UAS-CG13928* Phänotyp durch eine gleichzeitige Expression von *Cyclin E* abschwächen. Der beobachtete, ektopische Phänotyp muss dennoch nicht unspezifisch sein, da z. B. das Augen-Spezifizierungsgen *dachshund* ein ähnliches Verhalten wie *schmalspur* zeigt (Jiao et al., 2001).

4.2.3.6 Ist *schmalspur* ein transkriptioneller Repressor?

Interessanterweise konnte für gliale Protein Tramtrack gezeigt werden, dass es an der Regulation der Cyclin E Konzentration während des Zellzyklus beteiligt ist (Badenhorst, 2001). Tramtrack69 ist während der Embryogenese für die Repression neuronaler Gene in den Gliazellen verantwortlich (Giesen et al., 1997; Badenhorst, 2001). *tramtrack* reguliert die

Diskussion

Aufrechterhaltung glialer Differenzierung und verhindert gleichzeitig eine Rückkehr in den Zellzyklus durch eine Repression der *Cyclin E* Expression. Beim Verlust von *tramtrack* kommt es zu einer vermehrten glialen Proliferation, die Zellkerne dieser zusätzlichen, *repo*-positiven Gliazellen wirken deutlich kleiner als die Zellkerne wildtypischer Gliazellen (Badenhorst, 2001). Ein ähnlicher Phänotyp ist in *schmalspur* mutanten Embryonen zu beobachten (Abb. 45). In *tramtrack* mutanten Embryonen kommt es zu einem Kontakt der Fasciilin II-positiven Axone und der lateralen Gliazellen entlang der Mittellinie. Eine ähnliche Funktion von *schmalspur* und *tramtrack* zeigt sich auch bei dem Vergleich der Phänotypen der ektopischen Expression der Gene. Die Überexpression von *tramtrack69* und *schmalspur* in der Augenimaginalscheibe führt zu einem Verlust des Auges (Kumar and Moses, 2001) und die Expression in den SOP-Zellen führt in beiden Fällen zu einem Verlust der Microchaeten (Pi et al., 2001).

Ob *schmalspur* mit *tramtrack* interagiert oder vergleichbare Funktionen z. B. in den Neuronen übernimmt werden zukünftige Experimente zeigen. Erste Hinweise auf eine Funktion von *schmalspur* als transkriptioneller Repressor zeigte die Analyse von *schmalspur* mutanten Embryonen mit anti-Repo und dem Enhancer Trap *J29*. In beiden Fällen konnte eine ektopische Expression der glialen Marker in epidermalen Zellen nachgewiesen werden. Ob es zu einer solchen Expression möglicherweise auch in neuronalen Zellen kommt, wird momentan analysiert.

4.2.3.7 Ausblick

Die genaue Funktion von *schmalspur* für die Entwicklung des embryonalen Nervensystems und die Augenentwicklung konnte bisher noch nicht geklärt werden. Mit Hilfe der UAS-Konstrukte und der Vielzahl der *schmalspur* Mutationen sollte es möglich sein, sowohl die Interaktion mit den Augenspezifizierungsgenen, als auch mit den Regulatoren des Zellzyklus, wie *tramtrack* und *Cyclin E* abschließend zu klären.

5. Zusammenfassung

Wichtige Aspekte der Entwicklung und Funktion eines Nervensystems werden durch Neuronen-Glia Interaktionen kontrolliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen Mittellinienneuronen und Mittelliniengliazellen während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* analysiert. Die Analyse der wildtypischen Interaktionen und die detaillierte phänotypische und molekulare Analyse der Mutationen *klötzchen*, *kästchen* und *schmalspur* führte zu neuen Erkenntnissen über die Regulation der funktionellen Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen.

Durch die konfokale Analyse der Neuron-Glia Interaktionen im Wildtyp konnte eine direkte Interaktion der Mittellinien-Gliazellen mit den longitudinalen Axonen der Konnektive nachgewiesen werden. Die Mittellinien-Gliazellen senden lange Zellausläufer in mindestens drei unterschiedliche, parallel zur Mittellinie verlaufende Faszikel. Die Mittellinien-Gliazellen könnten über diese Zellfortsätze direkt die Positionierung der longitudinalen Axone über das repulsive Robo/Slit-System regulieren.

Durch eine detaillierte genetische und molekulare Analyse konnte gezeigt werden, dass *klötzchen* wahrscheinlich für einen neuen, evolutionär konservierten Regulator der α -spectrin mRNA Stabilität kodiert. Das Spectrin-Zytoskelett wird für die Ausbildung der Zellausläufer und die Aufrechterhaltung der Morphologie der Mittellinien-Gliazellen benötigt. Bei einem Verlust von *klötzchen* und dem daraus resultierenden Verlust von α -Spectrin kommt es zu einer Beeinträchtigung der glialen Migration und die Mittellinien-Gliazellen können die Kommissuren nicht mehr voneinander trennen und umhüllen. Zusätzlich werden *klötzchen* und α -spectrin für die Entwicklung der Muskulatur, des Auges und der Flügel benötigt.

kästchen kodiert für ein stark konserviertes Transmembranprotein, das für die Kontrolle der glialen Migration benötigt wird. *kästchen* wird in den Axonen des zentralen Nervensystems exprimiert und kann so direkt mit Gliazellen interagieren. Die Analyse der embryonalen und postembryonalen Funktionen von *kästchen* hat gezeigt, dass *kästchen* nicht nur als Stopp-Signal für die Gliazellen fungiert, sondern zahlreiche Zell-Zell Interaktionen kontrolliert. Hierbei interagiert *kästchen* mit dem Hedgehog-Signaltransduktionsweg.

schmalspur kodiert für ein neues Protein mit einer PHD-Domäne und ist möglicherweise an der Regulation der Transkription beteiligt. *schmalspur* wird für die Aufrechterhaltung des repulsiven Signalsystems während der Entwicklung des Nervensystems und für die Entwicklung der Augen benötigt.

6. Literatur

- Aasland, R., Gibson, T. J. and Stewart, A. F.** (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* **20**, 56-9.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.
- Amin, A., Li, Y. and Finkelstein, R.** (1999). Hedgehog activates the EGF receptor pathway during *Drosophila* head development. *Development* **126**, 2623-30.
- Anderson, M. G., Perkins, G. L., Chittick, P., Shrigley, R. J. and Johnson, W. A.** (1995). drifter, a *Drosophila* POU-domain transcription factor, is required for correct differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. *Genes & Dev* **9**, 123-137.
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K. and Goodman, C. S.** (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood nerve barrier in *Drosophila*. *Cell* **81**, 757-67.
- Badenhorst, P.** (2001). Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **128**, 4093-101.
- Bahri, S. M., Chia, W. and Yang, X.** (2001). The *Drosophila* homolog of human AF10/AF17 leukemia fusion genes (*Dalf*) encodes a zinc finger/leucine zipper nuclear protein required in the nervous system for maintaining *EVE* expression and normal growth. *Mech Dev* **100**, 291-301.
- Bai, J., Chiu, W., Wang, J., Tzeng, T., Perrimon, N. and Hsu, J.** (2001). The cell adhesion molecule Echinoid defines a new pathway that antagonizes the *Drosophila* EGF receptor signaling pathway. *Development* **128**, 591-601.
- Barres, B. A. and Barde, Y.** (2000). Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 642-8.
- Bashaw, G. J. and Goodman, C. S.** (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* **97**, 917-26.
- Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. and Goodman, C. S.** (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* **101**, 703-15.
- Bennett, V. and Baines, A. J.** (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* **81**, 1353-92.
- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z. and Steller, H.** (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell* **2**, 159-70.
- Bernardoni, R., Miller, A. A. and Giangrande, A.** (1998). Glial differentiation does not require a neural ground state. *Development* **125**, 3189-200.
- Bezzi, P. and Volterra, A.** (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 387-94.
- Bhat, K. M.** (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* **21**, 472-85.

Literatur

- Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. and Bellen, H. J.** (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833-45.
- Bier, E.** (1997). Anti-neural-inhibition: a conserved mechanism for neural induction. *Cell* **89**, 681-4.
- Bier, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1990). rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **4**, 190-203.
- Bonini, N. M., Bui, Q. T., Gray-Board, G. L. and Warrick, J. M.** (1997). The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* **124**, 4819-26.
- Bonini, N. M., Leiserson, W. M. and Benzer, S.** (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **72**, 379-95.
- Bonkowsky, J. L., Yoshikawa, S., O'Keefe, D. D., Scully, A. L. and Thomas, J. B.** (1999). Axon routing across the midline controlled by the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* **402**, 540-4.
- Booth, G. E., Kinrade, E. F. and Hidalgo, A.** (2000). Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development* **127**, 237-44.
- Borod, E. R. and Heberlein, U.** (1998). Mutual regulation of decapentaplegic and hedgehog during the initiation of differentiation in the *Drosophila* retina. *Dev Biol* **197**, 187-97.
- Bossing, T. and Brand, A. H.** (2002). Dephirin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **129**, 4205-18.
- Bossing, T. and Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* **120**, 1895-906.
- 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.
- Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M. and Abmayr, S. M.** (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* **14**, 1498-511.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T.** (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11041-8.

- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klämbt, C.** (1994). The ETS domain protein pointed P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* **370**, 386-9.
- Buescher, M., Hing, F. S. and Chia, W.** (2002). Formation of neuroblasts in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by SoxNeuro. *Development* **129**, 4193-203.
- Byers, T. J., Dubreuil, R., Branton, D., Kiehart, D. P. and Goldstein, L. S.** (1987). *Drosophila* spectrin. II. Conserved features of the alpha-subunit are revealed by analysis of cDNA clones and fusion proteins. *J Cell Biol* **105**, 2103-10.
- Cagan, R. L. and Ready, D. F.** (1989). Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina. *Genes Dev* **3**, 1099-112.
- Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C. Q. and Tomlinson, A.** (1994). RK2, a glial specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. *Development* **120**, 2957-66.
- Campos-Ortega, J. A.** (1993). Early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. In *Development of Drosophila*, vol. 2 (ed. C. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1091-1129: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Capili, A. D., Schultz, D. C., Rauscher, I. F. and Borden, K. L.** (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *Embo J* **20**, 165-77.
- Carthew, R. W.** (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 244-8.
- Casci, T., Vinos, J. and Freeman, M.** (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* **96**, 655-65.
- Chern, J. J. and Choi, K. W.** (2002). Lobe mediates Notch signaling to control domain-specific growth in the *Drosophila* eye disc. *Development* **129**, 4005-13.
- Cheyette, B. N., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. and Zipursky, S. L.** (1994). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* **12**, 977-96.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.
- Chu, H., Parras, C., White, K. and Jimenez, F.** (1998). Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by vnd in *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* **12**, 3613-24.
- Chu-LaGraff, Q. and Doe, C. Q.** (1993). Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the *Drosophila* CNS. *Science* **261**, 1594-7.
- Crews, S. T., Thomas, J. B. and Goodman, C. S.** (1988). The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* **52**, 143-151.
- Cutforth, T. and Rubin, G. M.** (1994). Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell* **77**, 1027-36.

- Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J. and Busslinger, M.** (1999). twin of eyeless, a second Pax-6 gene of Drosophila, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol Cell* **3**, 297-307.
- Dasso, M.** (1993). RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles. *Trends Biochem Sci* **18**, 96-101.
- De Matteis, M. A. and Morrow, J. S.** (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* **113**, 2331-43.
- Deitcher, D. L., Ueda, A., Stewart, B. A., Burgess, R. W., Kidokoro, Y. and Schwarz, T. L.** (1998). Distinct requirements for evoked and spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the Drosophila gene neuronal-synaptobrevin. *J Neurosci* **18**, 2028-39.
- Deshpande, G., Swanhart, L., Chiang, P. and Schedl, P.** (2001a). Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* **106**, 759-69.
- Deshpande, N., Dittrich, R., Technau, G. M. and Urban, J.** (2001b). Successive specification of Drosophila neuroblasts NB 6-4 and NB 7-3 depends on interaction of the segment polarity genes wingless, gooseberry and naked cuticle. *Development* **128**, 3253-61.
- Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. and Scott, M. P.** (1991). The prospero gene specifies cell fates in the Drosophila central nervous system. *Cell* **65**, 451-64.
- Dominguez, M. and de Celis, J. F.** (1998). A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the Drosophila eye. *Nature* **396**, 276-8.
- Dominguez, M. and Hafen, E.** (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the Drosophila eye. *Genes Dev* **11**, 3254-64.
- Dubreuil, R. R., Maddux, P. B., Grushko, T. A. and MacVicar, G. R.** (1997). Segregation of two spectrin isoforms: polarized membrane-binding sites direct polarized membrane skeleton assembly. *Mol Biol Cell* **8**, 1933-42.
- Dubreuil, R. R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J. and Goldstein, L. S.** (2000). Drosophila beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells. *J Cell Biol* **149**, 647-56.
- 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.
- Featherstone, D. E., Davis, W. S., Dubreuil, R. R. and Broadie, K.** (2001). Drosophila alpha- and beta-spectrin mutations disrupt presynaptic neurotransmitter release. *J Neurosci* **21**, 4215-24.
- Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T. M., Spradling, A. C. and Perrimon, N.** (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeodomain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes and Dev.* **4**, 1516-1527.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. *Development* **107**, 1-22.

- Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M. and Mehlen, P.** (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* **417**, 443-7.
- Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J. and Bier, E.** (1994). Dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev* **8**, 2602-16.
- Fujita, S. C., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A. and Shotwell, S. L.** (1982). Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7929-33.
- Georgiou, M. and Tear, G.** (2002). Commissureless is required both in commissural neurones and midline cells for axon guidance across the midline. *Development* **129**, 2947-56.
- Gertler, F. B., Bennett, R. L., Clark, M. J. and Hoffmann, F. M.** (1989). Drosophila abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell* **58**, 103-13.
- Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. and Klämbt, C.** (1997). Glial development in the Drosophila CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. *Development* **124**, 2307-16.
- Giniger, E.** (1998). A role for Abl in Notch signaling. *Neuron* **20**, 667-81.
- Glise, B., Jones, D. L. and Ingham, P. W.** (2002). Notch and Wingless modulate the response of cells to Hedgehog signalling in the Drosophila wing. *Dev Biol* **248**, 93-106.
- Gloor, G. B., Preston, C. R., Johnson-Schultz, D. M., Nassif, N. A., Phillis, R. W., Benz, W. K., Robertson, H. M. and Engels, W. R.** (1993). Type I repressors of P element mobility. *Genetics* **135**, 81-95.
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q.** (1993). Embryonic development of the Drosophila central nervous system: CSH press.
- Granderath, S., Bunse, I. and Klämbt, C.** (2000). gcm and pointed synergistically control glial transcription of the drosophila gene loco [In Process Citation]. *Mech Dev* **91**, 197-208.
- Granderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C. S., O'Kane, C. and Klämbt, C.** (1999). The *pointed* target gene *loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation. *Development* **126**, 1781-1791.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. and Skaer, H.** (1996). The Drosophila genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951-9.
- Greenwood, S. and Struhl, G.** (1999). Progression of the morphogenetic furrow in the Drosophila eye: the roles of Hedgehog, Decapentaplegic and the Raf pathway. *Development* **126**, 5795-808.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L. and Eide, D.** (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7220-4.
- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J.** (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. *Development* **125**, 2181-91.

- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788-92.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. and Technau, G. M.** (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-332.
- Hammarlund, M., Davis, W. S. and Jorgensen, E. M.** (2000). Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *J Cell Biol* **149**, 931-42.
- Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A.** (1996). Guidance cues at the *Drosophila* midline: Identification and characterization of two *Drosophila* netrin/*unc6* homologs. *Neuron* **17**, 217-228.
- Hazelett, D. J., Bourouis, M., Walldorf, U. and Treisman, J. E.** (1998). *decapentaplegic* and *wingless* are regulated by *eyes absent* and *eyegone* and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* **125**, 3741-51.
- Heberlein, U., Singh, C. M., Luk, A. Y. and Donohoe, T. J.** (1995). Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature* **373**, 709-11.
- Heberlein, U., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1993). The TGF beta homolog *dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* **75**, 913-26.
- Hidalgo, A.** (1991). Interactions between segment polarity genes and the generation of the segmental pattern in *Drosophila*. *Mech Dev* **35**, 77-87.
- Hidalgo, A. and Booth, G. E.** (2000). Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **127**, 393-402.
- Hidalgo, A. and Brand, A. H.** (1997). Targeted neuronal ablation: the role of pioneer neurons in guidance and fasciculation in the CNS of *Drosophila*. *Development* **124**, 3253-62.
- Hidalgo, A. and Ingham, P.** (1990). Cell patterning in the *Drosophila* segment: spatial regulation of the segment polarity gene *patched*. *Development* **110**, 291-301.
- Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77-87.
- Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. and Hotta, Y.** (2000). The *Drosophila* Netrin receptor *Frazzled* guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* **406**, 886-9.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F.** (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* **377**, 627-30.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y.** (1995). *glial cells missing*: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* **82**, 1025-1036.
- Hsiao, F. C., Williams, A., Davies, E. L. and Rebay, I.** (2001). *Eyes absent* mediates cross-talk between retinal determination genes and the receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Dev Cell* **1**, 51-61.
- Huang, J. D., Schwyter, D. H., Shirokawa, J. M. and Courey, A. J.** (1993). The interplay between multiple enhancer and silencer elements defines the pattern of *decapentaplegic* expression. *Genes Dev* **7**, 694-704.

Literatur

- 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., Attix, S., Gunning, D. and Zipursky, S. L.** (2002). Temporal control of glial cell migration in the *Drosophila* eye requires *gilgamesh*, *hedgehog*, and eye specification genes. *Neuron* **33**, 193-203.
- Hummel, T., Leifker, K. and Klämbt, C.** (2000). The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization. *Genes Dev* **14**, 863-73.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999a). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila* : I Identification of the required gene functions. *Dev. Biol.* **208**, 381-398.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999b). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila* : II Function of the different midline cells. *Development* **126**, 771-779.
- Hunt, D. M.** (1971). The physiological control of gene action in the *eyeless* and *eyegone* mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* **17**, 195-208.
- Ingham, P. W. and Hidalgo, A.** (1993). Regulation of *wingless* transcription in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**, 283-91.
- Ingham, P. W. and McMahon, A. P.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059-87.
- Ip, Y. T., Kraut, R., Levine, M. and Rushlow, C. A.** (1991). The dorsal morphogen is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts with a long-range repression element in *Drosophila*. *Cell* **64**, 439-46.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E. and Levine, M.** (1992a). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1728-39.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. and Levine, M.** (1992b). dorsal-twist interactions establish *snail* expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1518-30.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C. Q.** (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**, 511-21.
- Isshiki, T., Takeichi, M. and Nose, A.** (1997). The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* **124**, 3099-109.
- Ito, K., Urban, J. and Technau, G. M.** (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells during late embryogenesis. *Roux's Arch Dev Biol.* **204**, 284-307.
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K. W.** (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178-83.
- Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1989). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* **9**, 2402-11.

- Jasper, H., Benes, V., Atzberger, A., Sauer, S., Ansorge, W. and Bohmann, D.** (2002). A genomic switch at the transition from cell proliferation to terminal differentiation in the *Drosophila* eye. *Dev Cell* **3**, 511-21.
- Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T. and Levine, M.** (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **5**, 1881-91.
- Jiao, R., Daube, M., Duan, H., Zou, Y., Frei, E. and Noll, M.** (2001). Headless flies generated by developmental pathway interference. *Development* **128**, 3307-19.
- Jin, M. H., Sawamoto, K., Ito, M. and Okano, H.** (2000). The interaction between the *Drosophila* secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 2098-107.
- Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N. and Knust, E.** (2002). *Drosophila* crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr Biol* **12**, 1675.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S.** (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013-23.
- Kaprielian, Z., Runko, E. and Imondi, R.** (2001). Axon guidance at the midline choice point. *Dev Dyn* **221**, 154-81.
- Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L. A., Technau, G. M. and Dickson, B. J.** (2002). Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* **110**, 415-27.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* **96**, 785-94.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Tear, G.** (1998a). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**, 205-15.
- Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S. and Tear, G.** (1998b). Dosage sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* **20**, 25-33.
- Kimble, M., Incardona, J. P. and Raff, E. C.** (1989). A variant beta-tubulin isoform of *Drosophila melanogaster* (beta 3) is expressed primarily in tissues of mesodermal origin in embryos and pupae, and is utilized in populations of transient microtubules. *Dev Biol* **131**, 415-29.
- Kinrade, E. F., Brates, T., Tear, G. and Hidalgo, A.** (2001). Roundabout signalling, cell contact and trophic support confine longitudinal glia and axons in the *Drosophila* CNS. *Development* **128**, 207-216.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. and Klämbt, C.** (1994). The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-60.

Literatur

- Klämbt, C., Hummel, T., Menne, T., Sadlowski, E., Scholz, H. and Stollewerk, A.** (1996). Development and function of embryonic central nervous system glial cells in *Drosophila*. *Dev Genet* **18**, 40-9.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1991). The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**, 801-15.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**, 624-7.
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197-204.
- Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M. A. and Hiromi, Y.** (1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* **126**, 2515-25.
- Kumar, J. P.** (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet* **2**, 846-57.
- Kumar, J. P. and Moses, K.** (2001a). EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell* **104**, 687-97.
- Kumar, J. P. and Moses, K.** (2001b). The EGF receptor and notch signaling pathways control the initiation of the morphogenetic furrow during *Drosophila* eye development. *Development* **128**, 2689-97.
- Kurata, S., Go, M. J., Artavanis-Tsakonas, S. and Gehring, W. J.** (2000). Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2117-22.
- Lanoue, B. R., Gordon, M. D., Battye, R. and Jacobs, J. R.** (2000). Genetic analysis of vein function in the *Drosophila* embryonic nervous system. *Genome* **43**, 564-73.
- Lanoue, B. R. and Jacobs, J. R.** (1999). Rhomboid function in the midline of the *Drosophila* CNS. *Dev Genet* **25**, 321-30.
- Laski, F. A., Lio, D., Rubin, G. and G.** (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *C*. **44**, 7-19.
- Lasko, P. F. and Ashburner, M.** (1990). Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev* **4**, 905-21.
- Lee, J. K., Brandin, E., Branton, D. and Goldstein, L. S.** (1997). alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**, 353-62.
- Lee, J. K., Coyne, R. S., Dubreuil, R. R., Goldstein, L. S. and Branton, D.** (1993). Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **123**, 1797-809.
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F. and Freeman, M.** (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* **107**, 161-171.
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W.** (2002). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: Use of intron spacers. *Methods* **in press**.
- Lemke, G.** (2001). Glial control of neuronal development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 87-105.

- Li, T., Yang, C. T., Jin, D. and Stafford, D. W.** (2000). Identification of a *Drosophila* vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase. *J Biol Chem* **275**, 18291-6.
- Lin, D. M., Auld, V. J. and Goodman, C. S.** (1995). Targeted neuronal cell ablation in the *Drosophila* embryo: pathfinding by follower growth cones in the absence of pioneers. *Neuron* **14**, 707-15.
- Lin, D. M. and Goodman, C. S.** (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507-23.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. In *Academic Press, Inc.* (ed).
- Lombardo, C. R., Weed, S. A., Kennedy, S. P., Forget, B. G. and Morrow, J. S.** (1994). Beta II-spectrin (fodrin) and beta I epsilon 2-spectrin (muscle) contain NH₂- and COOH-terminal membrane association domains (MAD1 and MAD2). *J Biol Chem* **269**, 29212-9.
- Lopez-Schier, H. and St Johnston, D.** (2002). *Drosophila* nicastrin is essential for the intramembranous cleavage of notch. *Dev Cell* **2**, 79-89.
- Lucchesi, J. C.** (1968). Synthetic lethality and semi-lethality among functionally related mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **59**, 37-44.
- Lundell, M. J., Chu-LaGraff, Q., Doe, C. Q. and Hirsh, J.** (1996). The engrailed and huckebein genes are essential for development of serotonin neurons in the *Drosophila* CNS. *Mol Cell Neurosci* **7**, 46-61.
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P. A. and Moses, K.** (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **75**, 927-38.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. and Eide, D.** (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**, 2845-55.
- Mardon, G., Solomon, N. M. and Rubin, G. M.** (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473-86.
- Marfatia, S. M., Morais-Cabral, J. H., Kim, A. C., Byron, O. and Chishti, A. H.** (1997). The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem* **272**, 24191-7.
- Martin-Bermudo, M. D., Carmena, A. and Jimenez, F.** (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* **121**, 219-24.
- Matsuzaki, M. and Saigo, K.** (1996). hedgehog signaling independent of engrailed and wingless required for post-S1 neuroblast formation in *Drosophila* CNS. *Development* **122**, 3567-75.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A. and Pfrieder, F. W.** (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354-7.
- McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C. Q. and Mellerick, D. M.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the vnd homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev* **12**, 3603-12.

Literatur

- Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. and Le Bivic, A.** (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* **158**, 941-51.
- Mendell, J. T. and Dietz, H. C.** (2001). When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* **107**, 411-4.
- Menne, T. V. and Klämbt, C.** (1994). The formation of commissures in the *Drosophila* CNS depends on the midline cells and on the Notch gene. *Development* **120**, 123-33.
- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J.** (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17**, 203-15.
- Moore, J. D.** (2001). The Ran-GTPase and cell-cycle control. *Bioessays* **23**, 77-85.
- Moore, L. A., Broihier, H. T., Van Doren, M., Lunsford, L. B. and Lehmann, R.** (1998). Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* **125**, 667-78.
- Moorthy, S., Chen, L. and Bennett, V.** (2000). *Caenorhabditis elegans* beta-G spectrin is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function. *J Cell Biol* **149**, 915-30.
- Morel, V. and Schweisguth, F.** (2000). Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **14**, 377-88.
- Mueller, B. K.** (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* **22**, 351-88.
- Munro, S. and Freeman, M.** (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol* **10**, 813-20.
- Myat, A., Henry, P., McCabe, V., Flintoft, L., Rotin, D. and Tear, G.** (2002). *Drosophila* Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the roundabout receptor. *Neuron* **35**, 447-59.
- Nagler, K., Mauch, D. H. and Pfrieger, F. W.** (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol* **533**, 665-79.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S. and Crews, S. T.** (1990). The single minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* **63**, 63-75.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1991). The *Drosophila* single minded gene encodes a helix loop helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-67.
- Neumann, C. and Cohen, S.** (1997). Morphogens and pattern formation. *Bioessays* **19**, 721-9.
- Newsome, T. P., Asling, B. and Dickson, B. J.** (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* **127**, 851-60.
- Noordermeer, J. N., Kopczyński, C. C., Fetter, R. D., Bland, K. S., Chen, W. Y. and Goodman, C. S.** (1998). Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in *Drosophila*. *Neuron* **21**, 991-1001.

- Norman, K. R. and Moerman, D. G.** (2002). Alpha spectrin is essential for morphogenesis and body wall muscle formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **157**, 665-77.
- Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Overton, P. M., Meadows, L. A., Urban, J. and Russell, S.** (2002). Evidence for differential and redundant function of the Sox genes *Dichaete* and *SoxN* during CNS development in *Drosophila*. *Development* **129**, 4219-28.
- Pan, D. J., Huang, J. D. and Courey, A. J.** (1991). Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes Dev* **5**, 1892-901.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* **281**, 2031-4.
- Parker, D. S., Jemison, J. and Cadigan, K. M.** (2002). Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* **129**, 2565-76.
- Pascual, J., Martinez-Yamout, M., Dyson, H. J. and Wright, P. E.** (2000). Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. *J Mol Biol* **304**, 723-9.
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U.** (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143-9.
- Pesacreta, T. C., Byers, T. J., Dubreuil, R., Kiehart, D. P. and Branton, D.** (1989). *Drosophila* spectrin: the membrane skeleton during embryogenesis. *J Cell Biol* **108**, 1697-709.
- Pi, H., Wu, H. J. and Chien, C. T.** (2001). A dual function of phyllopod in *Drosophila* external sensory organ development: cell fate specification of sensory organ precursor and its progeny. *Development* **128**, 2699-710.
- Pickup, A. T. and Banerjee, U.** (1999). The role of star in the production of an activated ligand for the EGF receptor signaling pathway. *Dev Biol* **205**, 254-9.
- Pielage, J.** (1999). Genetische und molekulare Charakterisierung der *Drosophila* Gene *schmalspur*, *möchtegern* und *kästchen*. *Diplomarbeit*.
- Pinder, J. C. and Baines, A. J.** (2000). A protein accumulator. *Nature* **406**, 253-4.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J.** (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* **265**, 785-9.
- Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J. and Dickson, B. J.** (2000a). Crossing the Midline: Roles and Regulation of Robo Receptors. *Cell* **103**, 1033-1045.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J.** (2000b). Selecting a Longitudinal Pathway: Robo Receptors Specify the Lateral Position of Axons in the *Drosophila* CNS. *Neuron* **28**, 767-777.
- Raper, J. A.** (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 88-94.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* **1**, 47-57.

Literatur

- Raz, E. and Shilo, B. Z.** (1992). Dissection of the faint little ball (flb) phenotype: determination of the development of the Drosophila central nervous system by early interactions in the ectoderm. *Development* **114**, 113-23.
- Ready, D. F., Hanson, T. E. and Benzer, S.** (1976). Development of the Drosophila retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* **53**, 217-40.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E.** (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res* **11**, 1114-25.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K. and Engels, W. R.** (1988). A stable source of P-element transposase in Drosophila melanogaster. *Genetics* **118**, 6341-6351.
- Rong, Y. S. and Golic, K. G.** (2000). Gene targeting by homologous recombination in Drosophila. *Science* **288**, 2013-8.
- Rong, Y. S., Titen, S. W., Xie, H. B., Golic, M. M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B. M., Brodsky, M., Rubin, G. M. and Golic, K. G.** (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in D. melanogaster. *Genes Dev* **16**, 1568-81.
- Rorth, P.** (1996). A modular misexpression screen in Drosophila detecting tissue specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12418-22.
- Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). slit: an EGF-homologous locus of D. melanogaster involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* **55**, 1047-59.
- Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* **4**, 2169-87.
- Royet, J. and Finkelstein, R.** (1996). hedgehog, wingless and orthodenticle specify adult head development in Drosophila. *Development* **122**, 1849-58.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15.
- Rudner, D. Z., Fawcett, P. and Losick, R.** (1999). A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14765-70.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V. and Bate, M.** (2000). Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* **102**, 189-98.
- Ruohola, H., Bremer, K. A., Baker, D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1991). Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in Drosophila. *Cell* **66**, 433-49.
- Rusch, J. and Levine, M.** (1996). Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the Drosophila embryo. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 416-23.
- Sanson, B.** (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from Drosophila segmentation. *EMBO Rep* **2**, 1083-8.

- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of Drosophila embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T. and Simcox, A.** (1996). Vein is a novel component in the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**, 2302-13.
- Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A. and Klämbt, C.** (1997). Control of midline glia development in the embryonic Drosophila CNS. *Mech Dev* **64**, 137-51.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* **17**, 641-54.
- Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R. and Shilo, B. Z.** (1995). Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev* **9**, 1518-29.
- Schweitzer, R. and Shilo, B. Z.** (1997). A thousand and one roles for the Drosophila EGF receptor. *Trends Genet* **13**, 191-6.
- Seimiya, M. and Gehring, W. J.** (2000). The Drosophila homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* **127**, 1879-86.
- Serikaku, M. A. and O'Tousa, J. E.** (1994). sine oculis is a homeobox gene required for Drosophila visual system development. *Genetics* **138**, 1137-50.
- Shen, W. and Mardon, G.** (1997). Ectopic eye development in Drosophila induced by directed dachshund expression. *Development* **124**, 45-52.
- Shulman, J. M., Benton, R. and St Johnston, D.** (2000). The Drosophila homolog of C. elegans PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* **101**, 377-88.
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Laverly, T. R. and Rubin, G. M.** (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-16.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (2000a). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: A combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* **103**, 1019-1032.
- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (2000b). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* **28**, 753-766.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B.** (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the Drosophila nervous system. *Faseb J* **8**, 714-21.
- Sliter, T. J., Henrich, V. C., Tucker, R. L. and Gilbert, L. I.** (1989). The genetics of the Dras3-Roughened-ecdysoneless chromosomal region (62B3-4 to 62D3-4) in Drosophila melanogaster: analysis of recessive lethal mutations. *Genetics* **123**, 327-36.
- Song, H. and Poo, M.** (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* **3**, 81-8.

- Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S. and Crews, S.** (1997). The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* **124**, 4571-82.
- Soriano, N. S. and Russell, S.** (1998). The *Drosophila* SOX domain protein Dichaete is required for the development of the central nervous system midline. *Development* **125**, 3989-96.
- Starz-Gaiano, M., Cho, N. K., Forbes, A. and Lehmann, R.** (2001). Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development* **128**, 983-91.
- Stein, E. and Tessier-Lavigne, M.** (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-38.
- Stemerink, C. and Jacobs, J. R.** (1997). Argos and Spitz group genes function to regulate midline glial cell number in *Drosophila* embryos. *Development* **124**, 3787-96.
- Stevens, A. and Jacobs, J. R.** (2002). Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *J Neurosci* **22**, 4448-55.
- Stork, T.** (2002). Charakterisierung des alpha-spectrin-Lokus von *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit*.
- Sturtevant, M. A., Roark, M. and Bier, E.** (1993). The *Drosophila rhomboid* gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes & Dev.* **7**, 961-973.
- Suzuki, A. and Endo, T.** (2002). Ermelin, an endoplasmic reticulum transmembrane protein, contains the novel HELP domain conserved in eukaryotes. *Gene* **284**, 31-40.
- Takizawa, K. and Hotta, Y.** (2001). Pathfinding analysis in a glia-less gcm mutant in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **211**, 30-6.
- Tamagnone, L. and Comoglio, P. M.** (2000). Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* **10**, 377-83.
- Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C. S. and Seeger, M. A.** (1996). commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* **16**, 501-14.
- Tepass, U., Theres, C. and Knust, E.** (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787-99.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33.
- Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C. and Thisse, B.** (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product. *Cell* **65**, 1191-201.
- Thomas, G. H. and Williams, J. A.** (1999). Dynamic rearrangement of the spectrin membrane skeleton during the generation of epithelial polarity in *Drosophila*. *J Cell Sci* **112**, 2843-52.
- Thomas, G. H., Zarnescu, D. C., Juedes, A. E., Bales, M. A., Londergan, A., Korte, C. C. and Kiehart, D. P.** (1998). *Drosophila* betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye. *Development* **125**, 2125-34.

- Thomas, J. B., Crews, S. T. and Goodman, C. S.** (1988). Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* **52**, 133-141.
- Tracey, W. D., Jr., Ning, X., Klingler, M., Kramer, S. G. and Gergen, J. P.** (2000). Quantitative analysis of gene function in the *Drosophila* embryo. *Genetics* **154**, 273-84.
- Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. and Technau, G. M.** (1993). A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment specific lineage variants. *Development* **118**, 765-775.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. and Barres, B. A.** (2001). Control of synapse number by glia. *Science* **291**, 657-61.
- Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M.** (2001). *Drosophila* Rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**, 173-182.
- Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M.** (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *Embo J* **21**, 4277-86.
- van den Heuvel, M. and Ingham, P. W.** (1996). *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* **382**, 547-51.
- Van Doren, M., Broihier, H. T., Moore, L. A. and Lehmann, R.** (1998). HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* **396**, 466-9.
- Vassin, H., Vielmetter, J. and Campos-Ortega, J. A.** (1985). Genetic interactions in early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* **2**, 291-308.
- Vincent, S., Vonesch, J.-L. and Giangrande, A.** (1996). *glide* directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**, 131-139.
- Virchow, R.** (1846). Über das granuliert Aussehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg Z Psychiat* **3**, 242-250.
- von Ohlen, T. and Doe, C. Q.** (2000). Convergence of dorsal, *dpp*, and *egfr* signaling pathways subdivides the *drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev Biol* **224**, 362-72.
- Walker, C. S., Shetty, R. P., Clark, K., Kazuko, S. G., Letsou, A., Olivera, B. M. and Bandyopadhyay, P. K.** (2001). On a potential global role for vitamin K-dependent gamma-carboxylation in animal systems. Evidence for a gamma-glutamyl carboxylase in *Drosophila*. *J Biol Chem* **276**, 7769-74.
- Ward, M. P., Mosher, J. T. and Crews, S. T.** (1998). Regulation of bHLH PAS protein subcellular localization during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **125**, 1599-608.
- Weiss, J. B., Von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. and Scott, M. P.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* **12**, 3591-602.
- Wilkinson, D. G.** (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* **2**, 155-64.
- Wilkinson, M. F. and Shyu, A. B.** (2001). Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays* **23**, 775-87.
- Winberg, M. L., Mitchell, K. J. and Goodman, C. S.** (1998a). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* **93**, 581-91.

Literatur

- Winberg, M. L., Noordermeer, J. N., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Spriggs, M. K., Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1998b). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **95**, 903-16.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Xiong, W.-C., Okano, H., Patel, N. H. and Montell, C.** (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes & Dev.* **8**, 981-994.
- Xiong, W. C. and Montell, C.** (1995). Defective glia induce neuronal apoptosis in the repo visual system of *Drosophila*. *Neuron* **14**, 581-590.
- Xu, T., Caron, L. A., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1992). The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis. *Development* **115**, 913-22.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yu, H. H., Araj, H. H., Ralls, S. A. and Kolodkin, A. L.** (1998). The transmembrane Semaphorin Sema I is required in *Drosophila* for embryonic motor and CNS axon guidance. *Neuron* **20**, 207-20.
- Yu, T. W. and Bargmann, C. I.** (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1169-76.
- Zak, N. B., Wides, R. J., Schejter, E. D., Raz, E. and Shilo, B. Z.** (1990). Localization of the DER/flb protein in embryos: implications on the faint little ball lethal phenotype. *Development* **109**, 865-74.
- Zarnescu, D. C. and Thomas, G. H.** (1999). Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* **146**, 1075-86.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K. J., Cheng, Y. and Howard, K.** (1997). The *Drosophila* protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* **385**, 64-7.
- Zhou, L., Hashimi, H., Schwarz, L. M. and Nambu, J. R.** (1995). Programmed cell death in the *Drosophila* central nervous midline. *Curr. Biol.* **5**, 784-790.

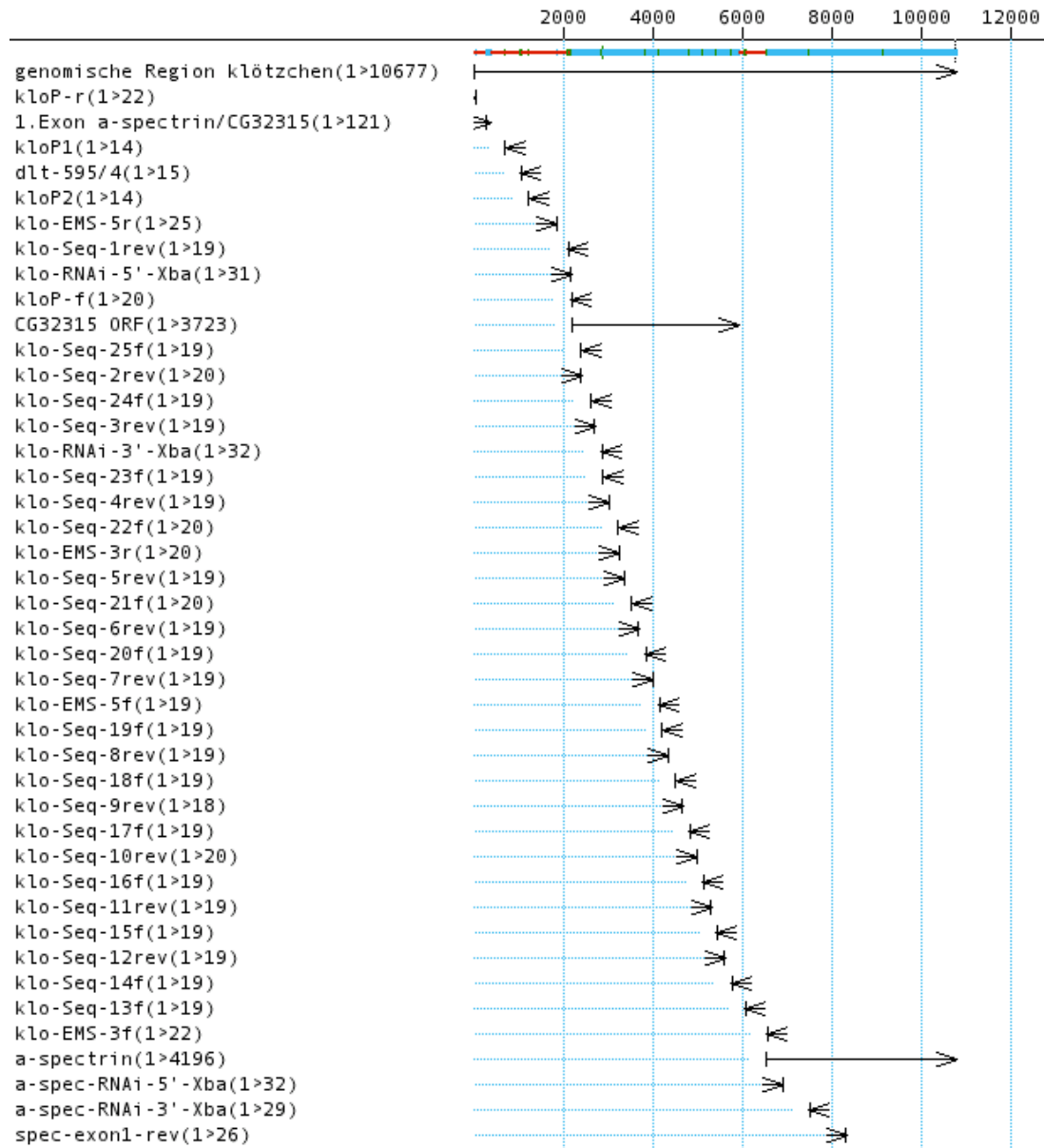
7. Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EST	<i>Expressed Sequenz Tag</i> (5' Sequenz einer cDNA)
EtOH	Ethanol
GS	Goat-Serum (Ziegen Serum)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MetOH	Methanol
ML-Gliazellen	Mittellinien-Gliazellen
ML-Neurone	Mittellinien-Neurone
MNB	Medianer Neuroblast
MP1	Midline Precursor 1, Mittellinien-Neuron
MP2	Midline Precursor 2, Mittellinien-Neuron
NBT	Nitro-blautetrazolium-Chlorid
ORF	offener Leseraster
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
ü. N.	über Nacht
VUM	<i>ventral unpaired median</i> (Neurone der Mittellinie)
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Die verwendeten Oligonukleotide zur Analyse von *klötzchen*

Zur Übersicht sind in der „Strategy View“ (Lasergene, DNASTar) der ORF von *CG32315* und der 5'-Bereich von *α-spectrin* sowie die P-Element Insertionsorte eingetragen.



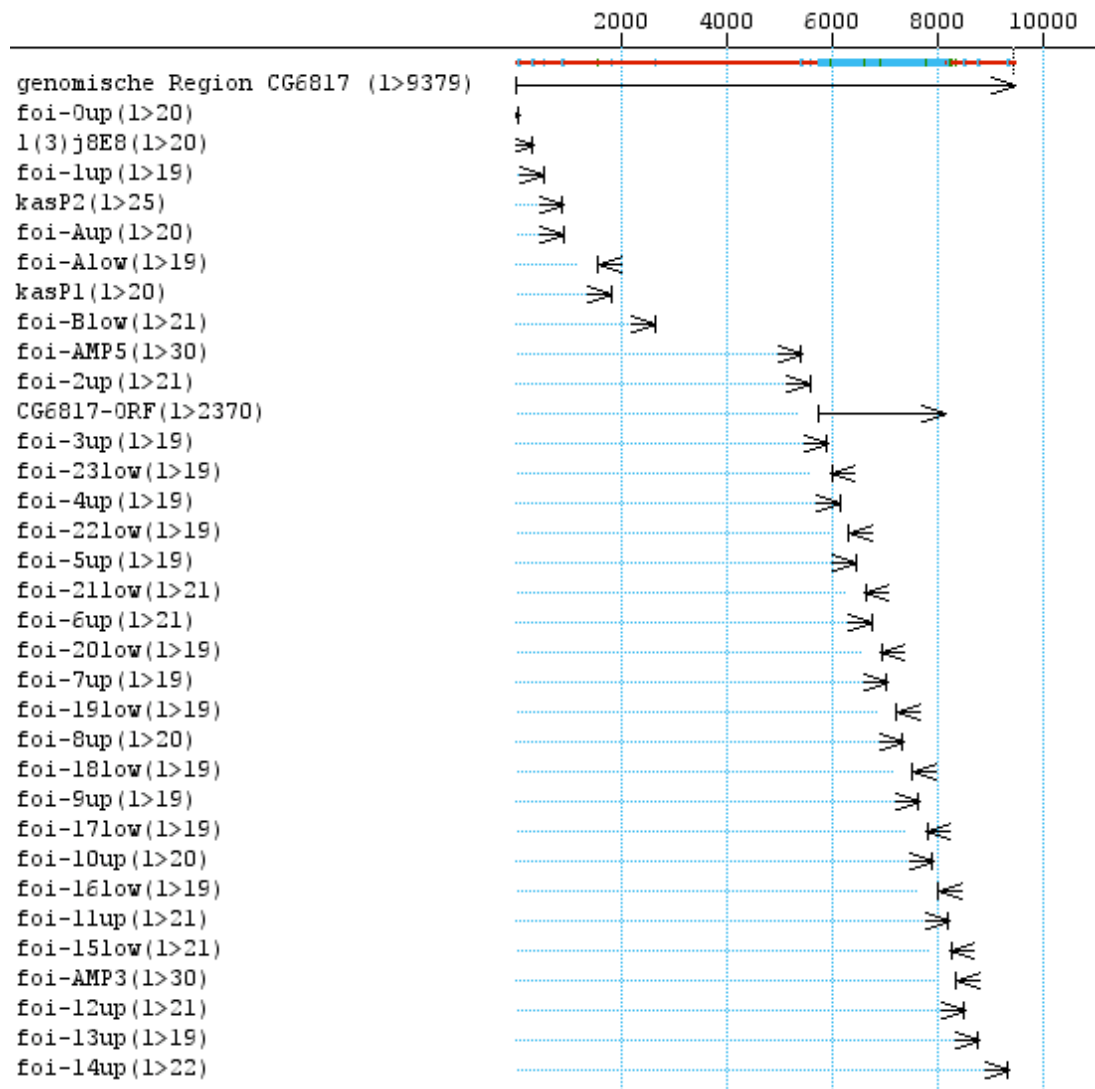
Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben

(artifizielle Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen)

klo-Seq-1rev	TCC GTT GCA GGG AAA CAA A
klo-Seq-2rev	AGA GGT ACT ACT ATT CGC AA
klo-Seq-3rev	CTG GTC AAT ACA CCT ATC C
klo-Seq-4rev	GGA AAT CAA AAG CGA AGC G
klo-Seq-5rev	GTT ACT TCT GCA GCT TGA C
klo-Seq-6rev	GCC GCG TAT TAT GGA TAT C
klo-Seq-7rev	TTG ATC TGC TCC AGC TAA C
klo-Seq-8rev	CAG TGG CCA CTT TGG AGC T
klo-Seq-9rev	AAG CGA AAA GTG GGC GGT
klo-Seq-10rev	TGA GAT CTT TCA AGA TGC CA
klo-Seq-11rev	CGG ATA TTG GAT TCA GCC T
klo-Seq-12rev	GGA ATC TTT GAC GGC TTG A
klo-Seq-13f	CGC TAT CTT ATC GGG TAC A
klo-Seq-14f	GCA AAG AGC GGC ATG AAG A
klo-Seq-15f	GAC CGC CTT TTG GGC TTT T
klo-Seq-16f	TGA GCA TAT GTA GAC CGC A
klo-Seq-17f	GTG GAC GCG TTT TGG GAT T
klo-Seq-18f	GCT TCC TGT GCC CTG TAA T
klo-Seq-19f	TGC AAC TGC TGT GGA CAA A
klo-Seq-20f	AGC GCT GTG CCA GCT TAT T
klo-Seq-21f	CCA CGT GAT AGT ATA CAT TC
klo-Seq-22f	ACC ACA AAA CTA AGT TCA CG
klo-Seq-23f	AGG AGC TGG CCG AAA CAT T
klo-Seq-24f	ACT TCC TGG CGT TGA TCT T
klo-Seq-25f	CGC AGT GCA CCT AAA AAG T
klo-EMS-3f	TGA CCG TGC CCA ACT GTA AAG A
klo-EMS-3r	TGG CCA ATC ACC CGT CAA AT
klo-EMS-5f	CCG CTA AAG GGC ATC ACA G
klo-EMS-5r	TTC CTC ATA ATT TCC CGC CTA ACT A
kloP-f	CAG TCA TGT TCC GGT GAT CT
kloP-r	TAG GAA ATA GTA GTC ATG CAT G
klo-RNAi-3'-Xba	AAC ATT CTT <u>TCT AGA</u> GGT CAT GGG TAA GAC AC
klo-RNAi-5'-Xba	AGG CAC AGA ATC <u>TAG ATC</u> ACC GGA ACA TGA C
a-spec-RNAi-3'-Xba	AGC TTC <u>TCT AGA</u> CGC ACA ATG GCT AAC TG
a-spec-RNAi-5'-Xba	CAG TAC TTC <u>AAT CTA GAT</u> GCC GAC GAG TTG GA
spec-exon1-f	AGC CTC GTC CTC CAA GTC GCG GAA G
spec-exon1-rev	GTC TGG CTG CCC AGG AGG AGA AGA TC

II. Die verwendeten Oligonukleotide zur Analyse von *kästchen*

Zur Übersicht sind in der „Strategy View“ (Lasergene, DNASTar) der ORF von *CG6817* sowie die P-Element Insertionsorte eingetragen.



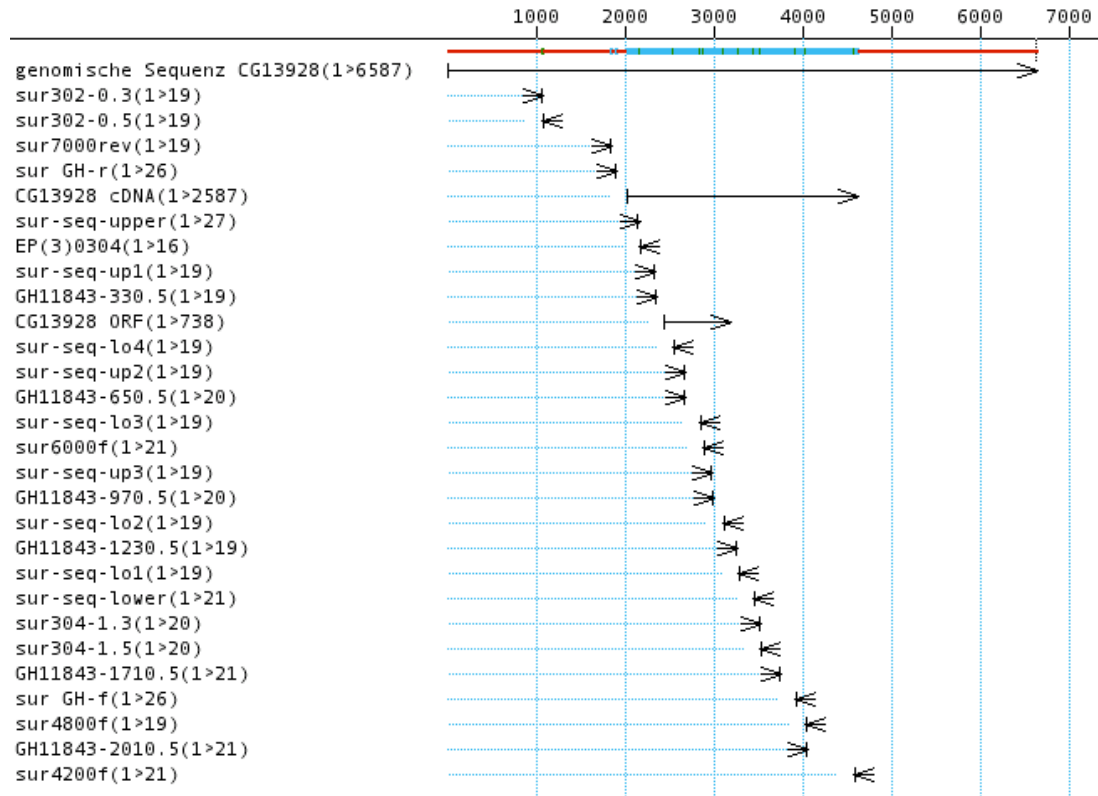
Anhang

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben

foi-Oup	TTG CAT CAC TGC TCC AAA TA
foi-1up	ACG GCC TCT TTC ATT CAC G
foi-2up	ATC GAA CGA AAT AAG CGA GTG
foi-3up	CCA GTG AAA CCA CCG ATC G
foi-4up	TCC ACT CGT TGG CCA GTG G
foi-5up	GCT GAG CGA TAA GGA CTT G
foi-6up	GGT TCC AGG TAT TAC AAG TAC
foi-7up	CAA AGA AAC CAT CGC GGG C
foi-8up	CTG CGT GGA AAT GAA TCA CC
foi-9up	GGA TGG CAT GGC CAT TGG T
foi-10up	TCT GTT CAT CTA CAT TGC CC
foi-11up	GTA GCG TAT TAT GTG AAT TGC
foi-12up	CAC ACC CAA TTT AAT GTA AGA
foi-13up	GTC TAG AGT GCG CAC GTT T
foi-14up	CTA CAA ACG GTA GGA AAT CAG A
foi-15low	CAA GAG GTT CTA TAG GCT TGG
foi-16low	CCA GTG ATT TGT GCG AGG C
foi-17low	CTC AGG ACT CCA GTC AAC A
foi-18low	CTC GTG CTC CCG CAG GAT C
foi-19low	GCC GCT ACA TCG AAG GGA A
foi-20low	TGA TCA TCC CCC GCT CAT C
foi-21low	GGA TGG GCC TCA AAA TTA AGT
foi-22low	CGT GAT GAT GAG CAT GGT G
foi-23low	CTC TTC TCG ATG GCG GGC T
foi-AMP3	CGG CTG TGT CTG TGG TTC TGT TTT GTC TAA
foi-AMP5	CGG TTC TGG CTT AAT GAG TGT GGG ATG GTA
foi-Aup	GCA CAC GTA ACT ACA CTG AT
foi-Blow	GGA TGT CAT GCG AAA TTT GAT

IV. Die verwendeten Oligonukleotide zur Analyse von *schmalspur*

Zur Übersicht sind in der „Strategy View“ (Lasergene, DNASTar) die cDNA-Sequenz und der ORF von *CG13928* sowie der Insertionsort des P-Elements *EP(3)0304* eingetragen.



Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben

<i>sur302-0.3</i>	ATA AAT ACC ACG CAG CTC G
<i>sur302-0.5</i>	CGA GCT GCG TGG TAT TTA T
<i>sur7000rev</i>	GGT CAA TCA TAT GGC GAG A
<i>sur GH-r</i>	TTA TCG GGG GTT GCA TGT GGT GTT GG
<i>sur-seq-upper</i>	CAC ACG GAC GCA GAC ACA GGA AGA AGA
<i>sur-seq-up1</i>	CGA ATT CTC TTT TTC CGC C
<i>GH11843-330.5</i>	CTG CTT GAA TCA GAC TCG G
<i>sur-seq-lo4</i>	TGG TAC CTT CTC CGG CAG T
<i>sur-seq-up2</i>	CCA AGC TGC ACA CCA TCG A
<i>GH11843-650.5</i>	CAC CAT CGA GGA AAA GGT CA

Anhang

sur-seq-lo3	TTC TGC TGC GGA TGC TTC T
sur6000f	TCG GTC GGA GTT ACA ATT GTT
sur-seq-up3	AGG ACG TGA TCG ATC ACC T
GH11843-970.5	GAT CAA CAA GAA CCT GGT CA
sur-seq-lo2	AAG AGC TCG TTG AAG CGG T
GH11843-1230.5	CTG AGC AGG ATG AGG AGG A
sur-seq-lo1	AGC TGC TCA TCC TCC TCA T
sur-seq-lower	GTC GGC GCA CTC GGG GGA ATC
sur304-1.3	TCG ACA CTC GAA AAC ATT GT
sur304-1.5	ACA ATG TTT TCG AGT GTC GA
GH11843-1710.5	GCA TTA CTG TCG TAC TTA AAT
sur GH-f	TCG GTG CCT GGA TTG ACT GGG TTG AA
sur4800f	TGT GAT AGG TAG TCG CAC A
GH11843-2010.5	TAC TTA ACC GTA ACC AAT ATC
sur4200f	GAC ATA AAT ACA TGC ATG CAT

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Christian Klämbt durchgeführt. Christian danke ich sehr herzlich für die permanente Unterstützung, die vielen Anregungen und die stete Diskussionsfreudigkeit.

Bei Prof. Dr. Andreas Püschel möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Der erste Dank geht an Karin Krukkert und besonders Gundula Edenfeld für die erfolgreiche und unterhaltsame Zusammenarbeit an den zahlreichen Benches. Hierbei nicht zu vergessen die beiden anderen Mitstreiter des Fliegenraums, Susanne Önel und Dirk Langehans.

Bedanken möchte ich mich bei Ingrid Bunse für die perfekten Sequenzen und bei Jens Hillebrand und Uwe Lammel für viele Anregungen und interessante Gespräche.

Ein Dankeschön auch an Kristina Schimmelpfeng, Thomas Hummel und Sebastian Granderath.

Vielen Dank an Sven Bogdan, Steffi Gögel, Mareike Strunk, Ariane Zierau, Jörn Hülsmeier, Tobias Stork und Georg Steffes für die gute Zusammenarbeit.

Besonders Bedanken möchte ich mich bei Julia Gärtner für die schöne Zeit in Münster.