

Biologie

Die Entwicklung der peripheren Gliazellen von *Drosophila melanogaster*

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

vorgelegt von
Gundula Edenfeld
aus Lippstadt

- 2004 -

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Janning
Tag der mündlichen Prüfung:	21.07.04
Tag der Promotion:	30.07.04

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Migration	1
1.1.1 Keimzellen	2
1.1.2 Tracheen	3
1.1.3 Border Cells	4
1.2 Migration während der Entwicklung des Nervensystems von <i>Drosophila</i>	5
1.2.1 Übersicht der Morphologie und Entwicklung des embryonalen Nervensystems	6
1.2.2 Migration der axonalen Wachstumskegel	7
1.3 Gliazellen in <i>Drosophila</i>	9
1.3.1 Gliogenese	10
1.3.2 Determination und Differenzierung der Mittelliniengliazellen	11
1.3.3 Determination und Differenzierung lateraler Gliazellen	12
1.3.4 Terminale Differenzierung von Gliazellen	12
1.4 Gliamigration in <i>Drosophila</i>	13
1.4.1 Migration der Mittelliniengliazellen	14
1.4.2 Migration der longitudinalen Gliazellen	15
1.4.3 Migration der peripheren Gliazellen	15
1.5 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen	18
2.1.3 Vektoren	25
2.1.4 Bakterienstämme	26
2.1.5 Antikörper	26
2.1.5.1 Primäre Antikörper	26
2.1.5.2 Sekundäre Antikörper	27
2.1.6 Verwendete Fliegenstämme	27
2.1.6.1 Balancer- und Wildtypstämme	27

2.1.6.2 Mutationen, Enhancer trap Insertionen, Reporter- und FRT Konstrukte	28
2.1.6.3 GAL4 Aktivatorlinien	30
2.1.6.4 UAS Effektorlinien	30
2.1.6.5 Duplikationen und Defizienzen	31
2.2 Methoden	33
2.2.1 Genetische Methoden	33
2.2.1.1 Fliegenzucht	33
2.2.1.2 Sammeln von Embryonen	33
2.2.1.3 Generierung von Rekombinanten zur klonalen Analyse	34
2.2.1.4 Erzeugung neuer Konstruktinsertionen	35
2.2.1.5 EMS Mutagenese zur Isolierung X-chromosomaler Mutationen	35
2.2.1.6 Bestimmung der Letalitätsphase	36
2.2.1.7 Keimbahntransformation	36
2.2.1.7.1 Präparation der Embryonen	36
2.2.1.7.2 Injektion der Embryonen	37
2.2.1.7.3 Selektion transgener Fliegen	37
2.2.1.7.4 Lokalisation der Insertionen	37
2.2.2 Histologische Methoden	38
2.2.2.1 Kutikulapräparation	38
2.2.2.2 <i>whole mount</i> Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> Embryonen	38
2.2.2.2.1 Antikörperfärbung von Einzelablagen	38
2.2.2.2.2 Antikörperfärbung von Massen-Eiablagen	39
2.2.2.2.3 Antikörperfärbung von Augenimaginalscheiben	40
2.2.2.3 Antikörperspezifische Nachweisreaktion	41
2.2.2.3.1 Alkalische Phosphatase (AP) Färbung	41
2.2.2.3.2 Meerrettichperoxidase (HRP) Färbung	41
2.2.2.4 Präabsorption des anti- β -Galaktosidase Antikörpers	41
2.2.2.5 <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Embryonen	42

2.2.2.5.1 Fixierung der Embryonen	42
2.2.2.5.2 Hybridisierung der Embryonen	43
2.2.2.5.3 Nachweisreaktion	43
2.2.2.5.4 Einbetten der Embryonen	44
2.2.2.6 Simultanfixierung von adulten Augen	44
2.2.2.6.1 Herstellung von beschichteten Objektträgern	45
2.2.2.6.2 Erstellung von Semidünnschnitten adulter Augen	45
2.2.2.7 Fixierung von Embryonen zur EM Analyse	45
2.2.2.7.1 Selektion und Vorfixierung	45
2.2.2.7.2 Behandlung der Embryonen mit Acrolein	46
2.2.2.7.3 Simultanfixierung	46
2.2.2.7.4 Herstellung Chrom-Alaun-Gelatine beschichteter Objektträger	47
2.2.2.7.5 Schneiden	47
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	47
2.2.3.1 Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde	47
2.2.3.2 Herstellung elektrokompenter Zellen (XL-1blue oder DH5-alpha <i>Escherichia coli</i>)	48
2.2.3.3 Bakterientransformation (Elektrotransformation)	48
2.2.3.4 DNA Restriktionen	49
2.2.3.5 Gelelektrophorese	49
2.2.3.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel	49
2.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen	50
2.2.3.8 Ligation von DNA Fragmenten	50
2.2.3.9 Mini-Präparation von Plasmid DNA	50
2.2.3.10 Midi-Präparation von Plasmid DNA	51
2.2.3.11 PCR	51
2.2.3.11.1 Standard PCR	51
2.2.3.11.2 Abweichungen von der Standard PCR	52
2.2.3.12 Sequenzierung	52

2.2.4 Biochemische Methoden	53
2.2.4.1 Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten	53
2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung und Vorbereitung von Proteinextrakten für die Gelelektrophorese	53
2.2.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	54
2.2.4.4 Western-Blotting und Immunodetektion von Proteinen	54
2.2.5 Zellkultur	55
2.2.5.1 Kultivierung von S2 Zellen	55
2.2.5.2 Antikörperfärbung an S2 Zellen	55
2.2.5.3 Transfektion von S2 Zellen	55
3 Ergebnisse	57
3.1 Charakterisierung und Migration peripherer Gliazellen	57
3.1.1 Klassifikation und Verteilung der peripheren Gliazellen	57
3.1.2 Migration der peripheren Gliazellen	58
3.1.3 Umhüllung der Axone durch Gliazellen	59
3.2 Genetische Ansätze	60
3.2.1 Expression einer <i>pointed-tramtrack</i> Chimäre führt zu einer <i>pointed</i> Phänokopie	60
3.2.2 Ektopische Expression der <i>pointed-tramtrack</i> Chimäre in der Augenimaginalscheibe	61
3.2.3 Das BTB- <i>pnt</i> Konstrukt wirkt als dominant Negativ zur <i>pointed</i> Genfunktion	61
3.2.4 Repression des <i>loco</i> Reporters durch BTB- <i>pnt</i>	63
3.3 Versuche zur Etablierung eines Repressorsystems	64
3.4 EMS Mutagenese zur Identifizierung von Genen, die für die Entwicklung der peripheren Gliazellen notwendig sind	65
3.4.1 Durchführung des Screens	66
3.4.2 Identifizierung der Phänotypen	66
3.4.2.1 Erste Kriterien der Sichtung	67
3.5 Entwicklungs- und Migrationsdefekte peripherer Gliazellen	67

3.5.1 Mutationen, die zu unregelmäßiger Migration peripherer Gliazellen führen	68
3.5.1.1 Migrationsdefekte	69
3.5.1.2 Neuronale PNS Defekte	70
3.5.2 Mutationen, die zu reduzierter Migration peripherer Gliazellen führen	70
3.5.3 Mutationen, die zu erhöhter Migration peripherer Gliazellen führen	71
3.5.4 Defekte in der Organisation der ZNS Axone	72
3.5.4.1 Reduktion und Desorganisation der Kommissuren und Konnektive	72
3.5.4.2 Reduktion der Konnektive	72
3.5.4.3 Fusionierte und defaszikulierte Kommissuren	73
3.5.5 Differenzierungs- und Faszikulationsdefekte	73
3.5.5.1 Mutationen mit erhöhter Anzahl <i>J29</i> positiver Nuclei	73
3.5.5.2 Mutationen mit Faszikulationsdefekten und geringerer Anzahl <i>J29</i> positiver Nuclei	74
3.6 Ektopische Expression der <i>J29</i> Enhancer trap Insertion	75
3.7 Klonale Analyse der X-chromosomalen Mutanten in der Augen-imaginalscheibe	75
3.7.1 Migration der Retinobasalgliazellen	76
3.7.2 Klonale Analyse der RBG Migration mit Hilfe <i>eyeless</i> -Flipase induzierter Klone	76
3.8 Analyse der Gliazellmigration in <i>Notch</i> mutanten Embryonen	80
3.8.1 Phänotypische Analyse der PNS- und Gliamigrationsdefekte <i>Notch</i> mutanter Embryonen	80
3.8.2 Expression eines <i>Su(H)/lacZ</i> Reporterkonstruktes in peripheren Gliazellen	82
3.8.3 Überexpressionsstudien der intra- und extrazellulären Domäne von Notch und dem Liganden Delta	83
3.9 Analyse der Gliazellmigration in drittchromosomalen Mutanten	85
3.9.1 Kartierung der <i>jaywalker</i> Mutation	85
3.9.2 Der ZNS Phänotyp <i>tango</i> mutanter Embryonen	86

3.9.3 Gliale Migrations- und neuronale Defekte in <i>tango</i> mutanten Embryonen	87
3.9.4 Expression eines dominant Negativs zur Tango Funktion resultiert in Gliamigrationsdefekten	88
3.9.5 Struktur und Lokalisation des Tango Proteins	90
3.9.5.1 Struktur des Tango Proteins	90
3.9.5.2 Lokalisation des Tango Proteins	90
3.9.6 Mögliche Interaktionspartner von Tango bei der Kontrolle der Migration peripherer Gliazellen	91
3.9.6.1 mRNA bzw. Proteinexpression möglicher Interaktionspartner	91
3.9.6.2 Erstellung von RNAi Konstrukten zur Identifizierung eines Interaktionspartners von Tango	94
3.10 Analyse des Gens <i>crooked neck</i>	95
3.10.1 <i>crooked neck</i> kontrolliert die Migration der peripheren Gliazellen	95
3.10.2 Das Gen <i>crooked neck</i>	96
3.10.2.1 Kartierung der <i>crooked neck</i> Mutation	96
3.10.2.2 Genstruktur und Sequenzanalyse der Allele <i>crn^{III-26H8}</i> und <i>crn^{IX-15H6}</i>	97
3.10.3 Analyse der <i>crooked neck</i> Expression	98
3.10.3.1 Analyse der mRNA-Expression	98
3.10.3.2 Lokalisation und ektopische Expression des Crn Proteins	98
3.10.4 Phänotypische Charakterisierung von <i>crooked neck</i>	101
3.10.4.1 Der <i>crooked neck</i> mutante Kutikulaphänotyp	101
3.10.4.2 ZNS Phänotypen <i>crooked neck</i> mutanter Embryonen	102
3.10.4.3 Muskeldefekte <i>crooked neck</i> mutanter Embryonen	102
3.10.4.4 Terminale Differenzierungsdefekte der peripheren Glia in <i>crooked neck</i> mutanten Embryonen	103
3.10.4.5 Ultrastrukturelle Analyse des glialen Phänotyps von <i>crooked neck</i>	104

3.10.4.6 Klonale Analyse der RBG Migration in <i>crn</i> ^{IX-15H6} Mutanten mittels der ey-FLP Technik	105
3.10.5 Analyse der RBG Migration im Wildtyp und in <i>crn</i> ^{IX-15H6} Mutanten mit Hilfe des MARCM Systems	106
3.10.5.1 Analyse der wildtypischen Morphologie und Migration der RBG im Wildtyp mit Hilfe des MARCM Systems	106
3.10.5.2 Analyse der Morphologie und Migration der RBG <i>crn</i> ^{IX-15H6} Mutanten mit Hilfe des MARCM Systems	108
3.10.6 Phänotypische Analyse des Gens <i>held out wings (how)</i> als möglichem Interaktionspartner von <i>crooked neck</i>	109
3.10.6.1 Analyse der peripheren Gliazellen in <i>how</i> mutanten Embryonen	110
3.10.6.2 Neuronale PNS Defekte in <i>how</i> und <i>crn</i> mutanten Embryonen	110
3.10.6.3 Doppelmutantenanalyse <i>how</i> und <i>crn</i> mutanter Embryonen	111
4 Diskussion	113
4.1 Konvertierung eines transkriptionellen Aktivators in einen Inaktivator	113
4.1.1 Die Gene <i>pointed</i> und <i>tramtrack</i>	113
4.1.2 Strukturfunktionsanalyse der Tramtrack BTB Domäne	114
4.1.3 Die Expression der BTB- <i>pnt</i> Proteinchimäre resultiert in einer Phänokopie <i>pointed</i> mutanter Phänotypen	115
4.2 Etablierung eines Repressorsystems zur Inaktivierung von Genen	117
4.3 Analyse der peripheren Gliazellen im Wildtyp	119
4.4 EMS Mutagenese zur Isolierung von Mutationen, die Defekte in der Migration der peripheren Gliazellen aufweisen	120
4.4.1 Der methodische Ansatz	120
4.4.2 Das Spektrum der erhaltenen Phänotypen	120
4.4.2.1 Zellzahländerung und Fehlmigration der peripheren Gliazellen	121

4.4.2.2 Neuronale PNS Organisation in Mutanten mit Migrationsdefekten der peripheren Gliazellen	122
4.5 Migration der Retinobasalgliazellen in der Augenimaginalscheibe	124
4.5.1 Analyse der wildtypischen Morphologie der Retinobasalgliazellen durch das MARCM System	125
4.5.2 Analyse der RBG Migration <i>eyeless</i> -FLP induzierter Klone	126
4.6 Analyse der Mutationen <i>Notch</i> , <i>tango</i> und <i>crooked neck</i>	128
4.6.1 Die Funktion von <i>Notch</i> während der Migration der peripheren Gliazellen	128
4.6.2 Analyse des Gens <i>tango</i>	130
4.6.3 Analyse des Gens <i>crooked neck</i>	132
4.6.3.1 Phänotypische Analyse der <i>crooked neck</i> Mutanten	132
4.6.3.2 Die Crooked neck Proteinstruktur	133
4.6.3.3 <i>crn</i> mRNA und Crn Proteinlokalisierung	134
4.6.3.4 Held out wings – ein möglicher Interaktionspartner von Crooked neck	135
5 Zusammenfassung	137
6 Literaturverzeichnis	138
7 Anhang	151

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Schema der Keimzellmigration
Abb.2:	Tracheenmigration
Abb.3:	Migration der <i>border cells</i>
Abb.4:	Axonale Wegfindung an der Mittellinie
Abb.5:	Gliazellen im embryonalen Nervensystem von <i>Drosophila</i>
Abb.6:	Migrationsrichtungen von Gliazellen
Abb.7:	Klassifikation und Verteilung der peripheren Gliazellen im embryonalen Nervensystem von <i>Drosophila melanogaster</i>
Abb.8:	Migration peripherer Gliazellen
Abb.9:	Umhüllung der Hauptaxontrakte des PNS durch periphere Gliazellen
Abb.10:	Detailansicht peripherer Gliazellen
Abb.11:	Vergleich durch ektopische Expression des BTB- <i>pnt</i> Konstruktes induzierter ZNS Phänotypen mit denen <i>tramtrack</i> bzw. <i>pointed</i> mutanter Embryonen
Abb.12:	Ektopische Expression des Fusionsproteins BTB- <i>pnt</i> in der Augenimaginalscheibe
Abb.13:	Adulte Augenphänotypen nach ektopischer BTB- <i>pnt</i> Expression
Abb.14:	Effekte der BTB- <i>pnt</i> Expression auf die Sevenless Signaltransduktionskaskade
Abb.15:	Ektopische Expression der BTB- <i>pnt</i> Chimäre reprimiert die <i>lacZ</i> Expression des <i>Rrk-lacZ 6.3 loco</i> Reporters
Abb.16:	Modelle zur Veranschaulichung der BTB/POZ vermittelten Repression
Abb.17:	EMS Mutagenese zur Identifizierung X-chromosomaler Mutationen
Abb.18:	Mutationen, die zu einer unregelmäßigen Migration peripherer Gliazellen führen - I
Abb.19:	Mutationen, die zu einer unregelmäßigen Migration peripherer Gliazellen führen - II
Abb.20:	Mutationen, die zu reduzierter Migration peripherer Gliazellen führen - I
Abb.21:	Mutationen, die zu reduzierter Migration peripherer Gliazellen führen - II
Abb.22:	Mutationen, die zu erhöhter Migration peripherer Gliazellen führen
Abb.23:	Defekte in der Organisation der ZNS-Axone: Reduktion und

	Desorganisation der Kommissuren und Konnektive
Abb.24:	Defekte in der Organisation der ZNS-Axone: Reduktion der Konnektive
Abb.25:	Defekte in der Organisation der ZNS-Axone: Fusionierte und defaszikulierte Kommissuren
Abb.26:	Mutationen mit erhöhter Anzahl <i>J29</i> positiver Nuclei
Abb.27:	Mutationen mit Faszikulationsdefekten und geringerer Anzahl <i>J29</i> positiver Nuclei
Abb.28:	Ektopische Expression der <i>J29</i> Enhancer trap insertion
Abb.29:	Wildtypische Migration und Verteilung der Retinobasalgliazellen in der Augenimaginalscheibe von <i>Drosophila melanogaster</i>
Abb.30:	Konfokale Analyse von <i>VII-17G8</i> mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe
Abb.31:	Konfokale Analyse von <i>N^{B-8X}</i> mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe
Abb.32:	Konfokale Analyse von <i>XII-14D1</i> mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe
Abb.33:	Konfokale Analyse von <i>VII-19H5</i> mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe
Abb.34:	Konfokale Analyse von <i>wex^{6-8F3}</i> mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe
Abb.35:	Schematische Zusammenfassung der Migrationsphänotypen der unterschiedlichen Mutanten
Abb.36:	Migrations- und Differenzierungsdefekte der peripheren Gliazellen in <i>Notch</i> mutanten Embryonen
Abb.37:	Migrations- und Differenzierungsdefekte der peripheren Gliazellen in <i>Notch^{ts}</i> mutanten Embryonen
Abb.38:	Konfokale Analyse der Expression eines <i>Su(H)lacZ</i> Reporterkonstruktes während der Migration der peripheren Gliazellen in den peripheren Gliazellen
Abb.39:	Überexpression der intrazellulären Domäne von <i>Notch</i> (<i>Notch^{intra}</i>) in lateralen Gliazellen via <i>loco</i> GAL4 resultiert in PNS, ZNS und Gliazellmigrationsdefekten
Abb.40:	ZNS Phänotypen <i>tango</i> mutanter Embryonen

Abb.41:	ZNS Phänotypen und Projektionsdefekte in <i>tango</i> mutanten Embryonen
Abb.42:	Migrationsdefekte der peripheren Gliazellen in <i>tango</i> mutanten Embryonen
Abb.43:	Überexpression eines dominant negativ wirkenden Tango Proteins mittels <i>loco</i> GAL4 resultiert in Gliamigrationsdefekten
Abb.44:	Konfokale Analyse der Tango Proteinexpression
Abb.45:	Tango Proteinstruktur, mögliche Interaktionspartner und Ergebnisse der Überexpressionsstudien <i>tango DN</i> Konstruktes
Abb.46:	Das mRNA Expressionsmuster von <i>dysfusion/cranky</i>
Abb.47:	Das mRNA Expressionsmuster von <i>trachealess</i>
Abb.48:	Das mRNA Expressionsmuster von <i>spineless</i>
Abb.49:	Das mRNA Expressionsmuster von <i>taiman</i>
Abb.50:	Analyse der Taiman- und Tangoexpression in Gliazellen
Abb.51:	Klonierungsstrategie von UAS-RNAi Konstrukten
Abb.52:	Migrationsphänotyp der peripheren Gliazellen und axonale Defekte in <i>crooked neck</i> Mutanten
Abb.53:	Struktur des Gens <i>crooked neck</i> und Sequenzanalyse zweier <i>crn</i> Allele
Abb.54:	Das mRNA Expressionsmuster von <i>crooked neck</i>
Abb.55:	Crooked Neck Proteinexpression
Abb.56:	Kutikulaphänotypen <i>crooked neck</i> mutanter Embryonen
Abb.57:	ZNS Phänotypen <i>crooked neck</i> mutanter Embryonen
Abb.58:	Muskelfdefekte <i>crooked neck</i> mutanter Embryonen
Abb.59:	Differenzierungsdefekte peripherer Gliazellen in <i>crooked neck</i> mutanten Embryonen
Abb.60:	Ultrastrukturelle Analyse des <i>crooked neck</i> mutanten Phänotyps - I
Abb.61:	Ultrastrukturelle Analyse des <i>crooked neck</i> mutanten Phänotyps - II
Abb.62:	Konfokale Analyse von <i>crn</i> ^{IX-15H6} mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe
Abb.63:	Konfokale, klonale Analyse der wildtypischen RBG Migration in der Augenimaginalscheibe durch das MARCM System - I
Abb.64:	Konfokale, klonale Analyse der wildtypischen RBG Migration in der Augenimaginalscheibe durch das MARCM System - II

Abb.65:	Konfokale, klonale Analyse der wildtypischen RBG Migration am Rand der Augenimaginalscheibe durch das MARCM System - III
Abb.66:	Konfokale, klonale Analyse <i>crooked neck</i> mutanter Gliazellen - I
Abb.67:	Konfokale, klonale Analyse <i>crooked neck</i> mutanter Gliazellen - II
Abb.68:	PNS Phänotypen <i>how</i> mutanter Embryonen
Abb.69:	Vergleich neuronaler PNS Defekte von <i>crn</i> ^{IX-15H6} und <i>how</i> ^{E44} mutanten Embryonen
Abb.70:	Analyse der peripheren Gliazellen in <i>crn;how</i> Doppelmutanten

1 Einleitung

1.1 Migration

Die Entwicklung von Zellen, die sich aktiv in Richtung einer Futterquelle bewegen oder sich selbst von ungünstigen Bedingungen entfernen können, stellt einen großen Schritt der Evolution dar. Zellmigration ist verbreitet von Einzellern bis hin zu komplexen, multizellulären Organismen. Multizellularität bedingt gleichzeitig die Notwendigkeit der Entwicklung selektiver Adhäsionsmechanismen, um einige Zellen an definierten Stellen verbleiben zu lassen. Tierische Organismen bedürfen einer Reihe migratorischer Prozesse: Keimzellen und ihre Vorläufer, Zellen des Immunsystems mit Abwehraufgaben, mesodermale Zellen, Tracheen und Zellen des Nervensystems - alle migrieren, um ihre Aufgaben zu erfüllen.

Zellmigration innerhalb des Körpers muß kontrolliert werden. Nicht alle Zellen dürfen ihren angestammten Ort verlassen und die, die migrieren, müssen einem zeitlich kontrollierten Raster folgen. Nach dem Wechsel vom statischen in einen motilen Zustand beginnt Migration. Zellen müssen den Kontakt zu den ursprünglichen Geweben lösen und sich in andere Richtungen fortbewegen. Hierzu empfangen und interpretieren sie Wegweiser der Umgebung, was impliziert, daß sie in der Lage sind, Instruktionen von außen zu befolgen, die Direktionalität, Geschwindigkeit und Termination der Migration kodieren. Letzteres ist von medizinischer Relevanz, da Tumorzellen sich nicht nur unkontrolliert teilen, sondern in metastasierenden Stadien unkontrollierte, invasive Migration zeigen. Auch während der Entwicklung kann jede Migrationsfehlfunktion schwere Folgen haben. Daher ist es wichtig, die genetischen Programme zu verstehen, die migrierende Zellen anfangs selektionieren, die den Migrationsprozeß überwachen und bestimmen, wann Zellen wieder sessil werden.

Ein klassisches System, um komplexe genetische Fragestellungen zu stellen und zu beantworten, stellt *Drosophila melanogaster* dar. Studien an Keimzellen, Tracheen, Border Cells, Neuronen oder Gliazellen haben unser Verständnis der genetischen Kontrolle der Migration in den letzten Jahren zunehmend bereichert. Im

folgenden werden kurz die Migration der Keimzellen, Tracheen und Border Cells skizziert, bevor detaillierter auf das Nervensystem mit axonaler Wegfindung und die Migrationstypen verschiedener Gliazellen eingegangen wird.

1.1.1 Keimzellen

Einer der ersten Migrationsprozesse im sich entwickelnden Embryo ist die Migration der Keimzellvorläufer (PGC Primordial Germ Cells) (Howard et al., 1993; Jaglarz and Howard, 1995). PGC migrieren in einem lockeren Verband von Zellen und werden im Blastodermstadium am posterioren Pol des Embryos gebildet. Zuerst werden sie passiv am darunterliegenden Gewebe haftend in die invaginierende Mitteldarmtasche befördert. Mit beginnender Gastrulation migrieren sie von dort aus aktiv durch das Darmepithel bis zum Gonadenmesoderm, wo sie koalieren. Viele Gene, die an diesen Vorgängen beteiligt sind, wurden bereits identifiziert (Broihier et al., 1998; Moore et al., 1998).

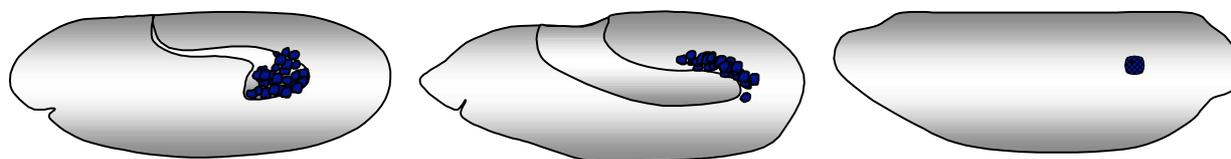


Abb. 1: Schema der Keimzellmigration

Das Entwicklungsalter der Embryonen steigt von links nach rechts. Die Embryonen sind grau skizziert; anterior ist links, ventral unten. Die Keimzellen sind blau dargestellt.

Beispiele hierfür sind *wunen* und *wunen2*, die redundante Lipidphosphatasen kodieren und PGC von bestimmten Regionen des Darms fernhalten (Starz-Gaiano et al., 2001; Zhang et al., 1997). Gegensätzliche Funktion üben *hedgehog* und das Gen *columbus* (eine HMG-CoA Reduktase) aus, welches an der Produktion eines attraktiven Signals im Gonadenmesoderm beteiligt ist (Deshpande et al., 2001; Van Doren et al., 1998). Ein Gen, welches für die Lokalisation eines solchen Signals im Mesoderm verantwortlich sein könnte, ist *slow as molasses (slam)* (Stein et al., 2002).

trapped in endoderm 1 (tre 1) hingegen wurde beschrieben als zellautonom fungierender G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), der spezifisch für die transepitheliale Migration der PGC benötigt wird. Die kleine GTPase Rho1 könnte eines der vermutlichen Tre 1 Ziele sein (Kunwar et al., 2003). Interessanterweise ist der Tre 1 Rezeptor (wenngleich entfernt) verwandt mit dem Chemokinrezeptor CXCR4, welcher Keimzellmigration in Zebrafisch und Maus lenkt, was darauf hindeutet, daß dieser Prozeß hoch konserviert ist (Doitsidou et al., 2002; Knaut et al., 2003; Molyneaux et al., 2003).

1.1.2 Tracheen

Zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung formiert sich - ausgehend von zehn ektodermalen Tracheenplakoden - das Tracheensystem. Aus den je 80 Zellen umfassenden Plakoden geht schließlich ohne weitere Zellteilungen durch Migrations- und Fusionsprozesse das dreidimensionale respiratorische System hervor (Samakovlis et al., 1996a; Samakovlis et al., 1996b).

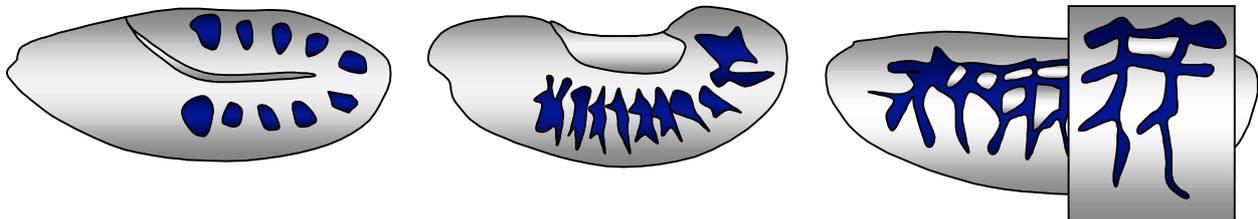


Abb. 2: Tracheenmigration

Das Entwicklungsalter der Embryonen steigt von links nach rechts. Die Embryonen sind grau dargestellt; anterior ist links, ventral unten. Die Tracheen sind blau skizziert.

Der JAK/STAT Signalweg ist entscheidend für die Spezifizierung des Tracheenschicksals. Er induziert die Expression des Transkriptionsfaktors *tracheiless (trh)* in den Tracheenplakoden (Brown et al., 2001; Chen et al., 2002). Die Migration trachealer Zellen und das Abzweigen der Tracheenäste basiert auf der kontrollierten Aktivierung von *breathless (btl)*, dem *Drosophila* FGF-Rezeptor, dessen Expression durch *trh* induziert wird (Klämbt et al., 1992; Reichman-Fried and Shilo, 1995). Btl wird aktiviert durch den Liganden Branchless, welcher in einem sehr

dynamischen Muster exprimiert wird, durch das die Tracheenäste vorskizziert werden (Hacohen et al., 1998; Lee et al., 1996; Sutherland et al., 1996).

Die Identifizierung trachealer Migrationssubstrate wie z.B. der sog. Bridge Cells ermöglicht, Zell-Zellkommunikation mit Migration zu verbinden (Wolf and Schuh, 2000). Auch Slit und „der Robocode“, welche axonale Wegfindung bestimmen und später noch genauer beschrieben werden, scheinen bei der Tracheenmigration eine Rolle zu spielen. Longitudinale, Mittellinien- und Channelgliazellen vermitteln als Migrationssubstrate entweder direkte oder indirekte Attraktion der Tracheen im ZNS wie Ablationsstudien gezeigt haben (Englund et al., 2002).

1.1.3 Border Cells

Einige Moleküle, die die Migration der Border Cells kontrollieren, konnten bereits identifiziert werden. Die Border Cells tragen während der Oogenese zur Bildung der Mikropyle bei, einer Struktur auf der Eihülle, die den Spermieeintritt erlaubt. Sie sind eine Gruppe von sechs bis zehn Follikelzellen, die im anterioren Bereich der Eikammer spezifiziert werden; ein zentrales Paar nicht-migrierender Zellen wird von einer Reihe motiler Zellen umsäumt. Diese Gruppe migriert zwischen den sog. Nährzellen bis zur Oocyte. Dort wandern sie dorsal und erreichen so eine Position unmittelbar über dem Nukleus der Oocyte (Duchek and Rorth, 2001; Montell, 2001).

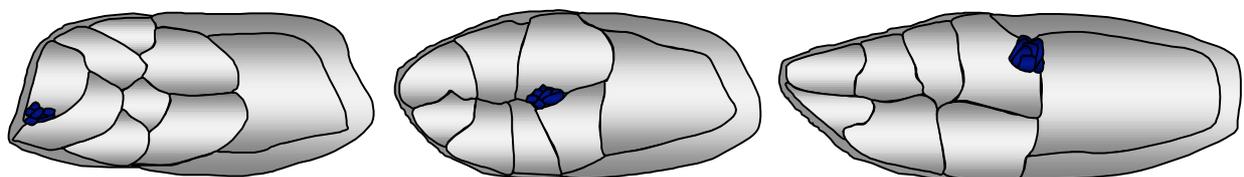


Abb. 3: Migration der Border Cells

Das Entwicklungsalter der Oocyten steigt von links nach rechts. Die Oocyten samt Nährzellen sind grau umrissen; anterior ist links. Die Border Cells sind blau dargestellt.

Die Initiation dieser Migration, d.h. die Spezifizierung migrierender Zellen aus dem Follikelepithel als auch die Initiation/Kompetenz der Migration steht – analog zu

dem zuvor genannten Prozessen während der Tracheenmigration – unter der Kontrolle des JAK/STAT Signalwegs (Silver and Montell, 2001). Das Steroidhormon Ecdyson, dessen Titer vor Beginn der Migration in der Eikammer sehr hoch ist, gibt zusätzlich das Startsignal. So führt vorzeitiges Einbringen von Ecdyson nebst gleichzeitiger Expression des Transkriptionsfaktors *slow border cells (slbo)* zu verfrühter Border Cell Migration (Montell et al., 1992). *slbo* war die erste identifizierte Mutation, die abnormes Migrationsverhalten zeigte. Inzwischen wurden viele Komponenten beschrieben, die unterhalb dieses Transkriptionsfaktors (z.B. *breathless* oder *shotgun*) fungieren (Godt and Tepass, 1998; Liu and Montell, 2001; Montell et al., 1992; Murphy et al., 1995; Niewiadomska et al., 1999). Nach Ligandenbindung assoziiert der Ecdysonrezeptor (Untereinheiten EcR und Ultraspiracle) mit dem Steroidhormoncoaktivator Taiman, um Transkription zu aktivieren (Bai et al., 2000; McDonald et al., 2003; Montell, 2001).

Auf dem Weg der Border Cells zwischen den Nährzellen hindurch verfolgen diese eine klare Linie zur Oocyte, was auf ein sekretiertes Richtungssignal schließen läßt. Dieses wurde zum einen hauptsächlich in PVF1 (PDGF/VEGF like factor) mit der Rezeptortyrosinkinase PVR (*Drosophila* PDGF/VEGF Rezeptor) auf Seiten der Border Cells gefunden (Duchek et al., 2001; McDonald et al., 2003). Dieser Migrationsabschnitt steht parallel unter der Kontrolle des EGF Rezeptor Signalwegs. Die Übersetzung der Signale in intrazelluläre Aktinzytoskeltänderungen, um Migration zu bewerkstelligen, verläuft u.a. über die kleine GTPase Rac (Duchek et al., 2001; Murphy and Montell, 1996). Der EGF Rezeptor mit dem Liganden Gurken lenkt die migrierenden Border Cells zuletzt nach dorsal, wo sie ihre finale Position unterhalb des Nukleus der Oocyte einnehmen (Duchek and Rorth, 2001).

1.2 Migration während der Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila*

Im sich entwickelnden Nervensystem ist die Motilität von Zellen von besonderer Bedeutung. Die Migration geschieht - wie bei der axonalen Wegfindung - beschränkt auf Zellkompartimente als auch auf der Ebene individueller, als Ganzes migrierender Zellen.

1.2.1 Übersicht der Morphologie und Entwicklung des embryonalen Nervensystems

Das embryonale zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus zwei Hirnhemisphären (lateral in der Kopfreion lokalisiert) und dem Bauchmark, welches drei Thorax- und acht Abdominalsegmente umfaßt, die aus segmentalen Ganglien (Neuromeren) bestehen. Zu Beginn der neuronalen Entwicklung kann zwischen zwei Gruppen neuronaler Vorläufer unterschieden werden: den Mittellinienvorläuferzellen und den Neuroblasten. Letztere entstammen dem sogenannten Neuroektoderm. Neuroektoderm und Mesoderm sind durch eine Zellreihe, dem Mesektoderm, voneinander getrennt, welches später die ZNS Mittellinie bildet.

Nach erfolgter Mesoderminvagination delaminieren Neuroblasten aus dem Neuroektoderm in den Raum zwischen Mesoderm und Ektoderm, nachdem sie zuvor via lateraler Inhibition selektioniert wurden. Nach der stufenweise erfolgten Neuroblastensegregation des Bauchmarks durchlaufen die Neuroblasten eine Reihe stammzellartiger Teilungen, durch die sie Neurone und Gliazellen generieren (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Die Stammbäume der 30 Neuroblasten wurden identifiziert (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Dem Mesektoderm entstammen sieben bis acht segmental angeordnete Mittellinienstammzellen, die nicht komplett delaminieren, sondern mit filigranen cytoplasmatischen Fortsätzen verankert bleiben (Bossing and Technau, 1994; Klämbt and Goodman, 1991). Pro abdominalem Neuomer entstehen schließlich gesamt etwa 350 Neurone und 60 Gliazellen.

Die Differenzierung der Neurone und Gliazellen beginnt ab dem Stadium des Keimstreifrückzugs mit dem Auswachsen der Axone und der Expression neuron- oder gliaspezifischer Marker, die durch spezifische Antikörper detektiert werden können. Eine kleine Gruppe von Neuronen, die sog. Pionierneurone, legen mit ihren Axonen die Grundverläufe der späteren longitudinalen und transversen axonalen Trakte fest (Jacobs and Goodman, 1989a; Jacobs and Goodman, 1989b). Die meisten Axone sind in späteren Stadien der Entwicklung in die anteriore und die posteriore Kommissur (ac bzw. pc) und die beiden Konnektive organisiert, die das klassische Strickleiternnervensystem der Insekten darstellen.

Die Verbindung zwischen ZNS und dem embryonalen peripheren Nervensystem (PNS) stellen pro Segment der intersegmentale (ISN) und der segmentale Nerv (SN) dar; der ISN verläuft posterior der posterioren Kommissur während der SN zwischen anteriorer und posteriorer Kommissur in die Peripherie läuft. In diesen Trakten faszikulieren Axone, die aus unterschiedlichen Richtungen kommen, nämlich die Motoaxone, die aus dem ZNS heraus projizieren, als auch die Axone der sensorischen Organe, die sich in Richtung ZNS orientieren. In Thorax- und Abdominalsegmenten können vier Gruppen sensorischer Organe unterschieden werden: die ventralen Gruppen, die dorsale und die laterale Gruppe. Sensorische Axone der dorsalen und lateralen Gruppe vereinigen sich im anterioren Faszikel, dem ISN, und die der ventralen Gruppen laufen in ein posteriores Faszikel, den SN.

1.2.2 Migration der axonalen Wachstumskegel

Diese Art der Migration geschieht auf Ebene einzelner Zellkompartimente, der Wachstumskegel. Der Wachstumskegel bildet den Anfang eines wachsenden Axons, geht Interaktionen mit diversen Substraten ein und steuert so das Verhalten der Neurone. Dies resultiert bei der endgültigen Verschaltung in hochpräzisen und spezifisch verflochtenen Netzwerken.

Wie beschrieben, senden die meisten Neurone ihre Axone über die Mittellinie in die anteriore bzw. posteriore Kommissur. Ein kommissurales Axon muß anfangs die richtige Kommissur finden und zudem nicht ipsilateral in das Konnektiv projizieren. Dann muß es auf die Mittellinie zuwandern, diese nach Erreichen aber wieder verlassen, um auf der anderen Seite den longitudinalen Axonwegen zu folgen, die es ipsilateral ignorierte (ipsilateral navigierende Neurone dürfen nie die Mittellinie kreuzen). Erneutes Umkehren, d.h. wiederholtes Kreuzen der Mittellinie, darf nicht geschehen.

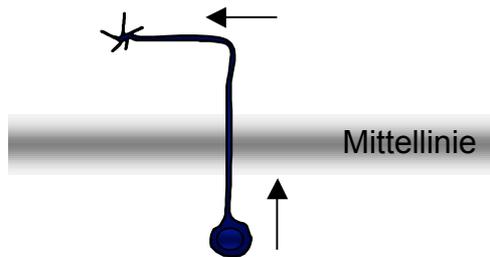


Abb. 4: Axonale Wegfindung an der Mittellinie

Navigation des Axons (blau) über die Mittellinie (grau).

Der Wachstumskegel muß attraktive und repulsive Signale (entweder über große Distanzen oder zellgebunden) wahrnehmen und umsetzen um zu migrieren (Mueller, 1999; Song and Poo, 2001; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Die Mittellinie exprimiert die hoch konservierten, sekretierten Netrine, die vermutlich als Gradient eine Attraktion zur Mittellinie vermitteln (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Der Netrin Rezeptor ist Frazzled, *frazzled* mutante Embryonen zeigen einen *Netrin*-ähnlichen Phänotyp: das Fehlen von Kommissuren (Kolodziej et al., 1996). Nach Kreuzen der Mittellinie jedoch kann das vormals attraktive Netrin Signal durch Kombination des Unc 40/Unc 5 heterodimeren Rezeptors als repulsives Signal aufgenommen werden (Hong et al., 1999; Leonardo et al., 1997).

Die Repulsion von der Mittellinie geschieht über das Slit/Robo-System. In *slit* mutanten Embryonen kollabieren durch die nun vorherrschenden Attraktionssignale alle Axone an der Mittellinie (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988). Slit ist wie Netrin ein in den extrazellulären Raum sekretiertes Protein, welches proteolytisch gespalten wird (Brose et al., 1999; Brose and Tessier-Lavigne, 2000; Rothberg and Artavanis-Tsakonas, 1992; Rothberg et al., 1990). Rezeptoren für das Slit Signal werden codiert durch die *roundabout (robo)* Gene: *robo 1*, *robo 2* (auch: *leak*) und *robo 3* (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Kidd et al., 1998a; Seeger et al., 1993). In *robo* mutanten Embryonen kreuzen zu viele Axone die Mittellinie. Die Robo Proteine sind in unterschiedlichen Subsets von Neuron lokalisiert; durch ihr Zusammenwirken werden u.a. die Axone in die distinkten longitudinalen Faszikel organisiert (Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000).

An der Mittellinie muß es einen Bereich geben, der zwischen Netrin vermittelter Attraktion auf Slit Repulsion zum Verlassen der Mittellinie umschaltet. Ein Gen, welches hier eine Rolle spielt, ist *commissureless (comm)*. In *comm* mutanten Embryonen fehlen alle Kommissuren. *robo* und *comm* Doppelmutanten zeigen - ebenso wie eine (dosisabhängige) Überexpression von *comm* allein - dem *robo* Funktionsverlust vergleichbare ZNS Phänotypen (Kidd et al., 1998b; Tear et al., 1996). *Comm* scheint also die Expression von *Robo* zu regulieren. Weitere Studien ergaben, daß *Comm* *Robo* Level in den Wachstumskegeln zellautonom reguliert: Vor Kreuzen der Mittellinie wird *Robo* durch *Comm* degradiert, nach Kreuzen der Mittellinie wird vermutlich *Comm* inaktiviert und *Robo* kann so – in den Wachstumskegel gebracht - auf Slit reagieren (Keleman et al., 2002; Myat et al., 2002) zur Übersicht: (Dickson, 2002).

1.3 Gliazellen in *Drosophila*

Insekten besitzen im Vergleich zu den Vertebraten eine weitaus geringere Anzahl an glialen Zellen. Bei Vertebraten kann die Anzahl der Gliazellen die der Neurone um das Zehnfache übersteigen während bei *Drosophila* etwa nur ein Zehntel der neuronalen Zellzahl Gliazellen sind. Diese im Vergleich wenigen glialen Zellen erfüllen jedoch ähnliche Aufgaben wie bei den Vertebraten (Lemke, 2001). Diese Aufgaben bestehen nicht nur in der Abschirmung der Neurone, der Etablierung der Blut-Hirn-Schranke, sondern auch während früher Entwicklungsstadien (z.B. als Migrationssubstrat für Axone oder Tracheen) (Englund et al., 2002; Granderath et al., 1999; Klämbt et al., 1991; Takizawa and Hotta, 2001).

Die glialen Zelltypen der abdominalen Segmente in *Drosophila* wurden mittels unterschiedlicher Markerlinien detailliert beschrieben und kategorisiert (Ito et al., 1995; Klämbt and Goodman, 1991). Drei Hauptkategorien sind zu unterteilen: die oberflächenassoziierte Glia, die mit dem Neuropil assoziierte und die cortexassoziierte Glia. Diese lassen sich nochmals in Subtypen basierend auf Morphologie und Lokalisation in ZNS und PNS unterscheiden.

Subperineuralglia und Channelglia zählen zu der oberflächenassoziierten Glia. Es gibt 16-18 Subperineuralgliazellen pro abdominalem Hemisegment, die das

ZNS in allen Richtungen umgeben. Sie sind die mengenmäßig größte Gruppe glialer Zellen. Die Channelglia bekleidet die vertikalen Kanäle, die an den Segmentgrenzen durch das Bauchmark ziehen. Die Cell Body Glia ist - verteilt an den Somata der Neurone - im Cortex des Bauchmarks zu finden. Die Neuropilglia formt eine Hülle um das gesamte Neuropil. Zu ihr gehören die longitudinale Glia (auch Interface Glia), die die longitudinalen Axontrakte umhüllt, die Mittellinienglia, die die Kommissuren umhüllt und die Nerve Root Glia, die die aus dem ZNS austretenden Segmental- und Intersegmentalnerven umkleidet. Im PNS gibt es die Exit und periphere Glia, die bis auf wenige Zellen im ZNS geboren wird und dann in das PNS wandert. Aufgrund ihrer *gcm* Expression werden oft alle Gliazellen bis auf Mittellinien- und Channelgliazellen als laterale Gliazellen zusammengefaßt (Granderath and Klämbt, 1999; Jones, 2001).

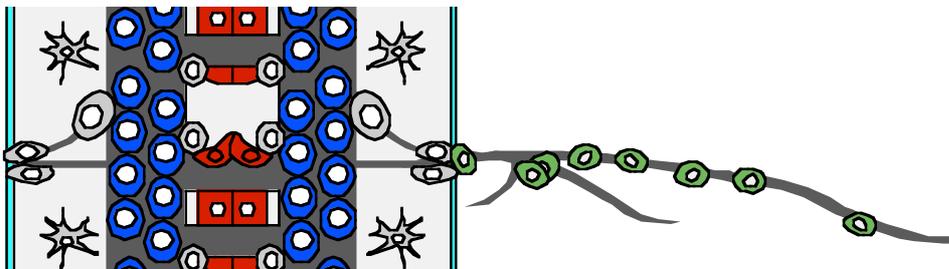


Abb. 5: Gliazellen im embryonalen Nervensystem von *Drosophila*

Schematische Darstellung der Lokalisation der longitudinalen Glia, der Mittellinienglia und der peripheren Glia im Nervensystem eines Stadium 16 Embryos

1.3.1 Gliogenese

Wie beschrieben, entstammen fast alle Gliazellen der abdominalen Region aus dem Neuroektoderm (es existieren drei verschiedene Neuroblasten: Neuroblasten generieren nur Neurone, Glioblasten nur Gliazellen und Neuroglioblasten Gliazellen und Neurone). Ausnahme sind die Mittelliniengliazellen, welche sich aus dem Mesektoderm herleiten. Im PNS delaminieren SOPs vom Ektoderm und generieren Gliazellen, Neurone und andere, sog. unterstützende Zellen (Lage et al., 1997; Wang et al., 1997). Neuroblasten und Neuroglioblasten generieren im ZNS durch Zyclen von 1-12 asymmetrischen Teilungen

Ganglionmutterzellen (GMCs – Ganglion Mother Cells), welche ihrerseits Neurone und/oder Gliazellen hervorbringen (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Alle NB erhalten eigene Identität durch spezifische Segregationsorte, Zeitpunkte der Teilungen, und die Expression spezifischer Marker (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Zellstammbaumanalysen zeigten, daß der Großteil an Gliazellen von den am weitesten dorsal am lateralen Rand des Neuroektoderms liegenden Stammzellen generiert wird.

1.3.2 Determination und Differenzierung der Mittelliniengliazellen

Nach Delamination der sieben bis acht Vorläuferzellen teilen sich die anteriorsten zwei bis drei erneut und differenzieren sich zu den Mittelliniengliazellen (Klämbt et al., 1991). Die restlichen werden zu den Neuronen der Mittellinie, zu denen u.a. auch die VUM-Neurone gehören (Bossing and Technau, 1994). Das Gen *single minded* (ein bHLH-PAS Protein) ist das Masterregulatorgen der Mittellinie und determiniert mesektodermales Schicksal (Nambu et al., 1991). Weitere Entscheidung zum neuronalen oder glialen Mittellinienschicksal wird durch Kombination von Sim mit verschiedenen Segmentierungsgenen getroffen (Hummel et al., 1999b; Menne et al., 1997).

Die Anzahl der Mittelliniengliazellen wird sekundär wieder auf drei bis vier reduziert, u.a. geschieht dies über Ecdyson Signalsysteme, Argos und final durch Apoptose (mittels der Zelltodgene *head involution defective (hid)* und *reaper*) (Bergmann et al., 2002; Dong and Jacobs, 1997; Giesen et al., 2003; Jin et al., 2000; Scholz et al., 1997; Stemerink and Jacobs, 1997; Zhou et al., 1995; Zhou et al., 1997). Sowohl diese Elimination als auch vorherige Differenzierungsschritte der verbleibenden Gliazellen sind abhängig von der Aktivität des Gens *faint little ball*, welches das *Drosophila* EGF-Rezeptorhomolog DER codiert (Scholz et al., 1997; Zak et al., 1990). Abhängig von Sim und Tango (einem weiteren bHLH-PAS Protein) wird DER spezifisch in den Mittelliniengliazellen exprimiert (Sonnenfeld et al., 1997; Ward et al., 1998). Spitz, der Ligand für DER, wird wiederum abhängig von Rhomboid und Star aktiviert (Schweitzer et al., 1995) zur Übersicht: (Klämbt, 2000). Über DER und Ras wird die MAPK Rolled aktiviert, welche dann den Transkriptionsfaktor PointedP2 phosphoryliert. PointedP2 ist wie sein Antagonist Yan

so an der weiteren Mittelliniengliadifferenzierung beteiligt ist (Brunner et al., 1994; Rebay and Rubin, 1995; Scholz et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor *Tramtrack* wird gebraucht, um in den Mittelliniengliazellen neuronale Differenzierung zu reprimieren (Giesen et al., 1997).

1.3.3 Determination und Differenzierung lateraler Gliazellen

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *glial cells missing (gcm)* legt in neuronalen Vorläuferzellen gliales Schicksal fest (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996). Dies geschieht unabhängig von einer neuronalen Vorbestimmung dieser, da eine ektopische *gcm* Expression in z.B. mesodermalen Zellen dort Expression glialer Marker induzieren kann (Bernardoni et al., 1998). *reversed polarity (repo)*, *pointed (pnt)* und *gcm2* sind bekannte *gcm* Zielgene, die gliales Schicksal fördern und in embryonalen Gliazellen exprimiert werden (Campbell et al., 1994; Klaes et al., 1994; Klämbt, 1993; Xiong et al., 1994). Der Repressor *tramtrack (ttk)* dient auch in diesem Kontext dazu, neuronale Zellschicksale zu unterdrücken (Giesen et al., 1997). Es sind bereits einige Gene als Kandidaten beschrieben worden, die unterhalb von *gcm* z.B. die weitere Spezifizierung der einzelnen Gliatypen steuern könnten (Egger et al., 2002; Freeman et al., 2003).

1.3.4 Terminale Differenzierung von Gliazellen

Es wurden einige Gene identifiziert, die am Prozeß der terminalen glialen Differenzierung, z.B. der Etablierung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind: *locomotion defective (loco)*, *axotactin (axo)*, *gliotactin (gli)*, *frayed (fray)*, *neurexin (nrx)*, *heartless (htl)*, *draper (drpr)* und *wrapper (wrpr)*, welches allein in den Mittelliniengliazellen exprimiert wird (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996; Freeman et al., 2003; Granderath et al., 1999; Leiserson et al., 2000; Noordermeer et al., 1998; Shishido et al., 1997; Yuan and Ganetzky, 1999). Exemplarisch sollen einige der genannten Gene näher dargestellt werden. Der FGF Rezeptor *Htl* wird in den longitudinalen Gliazellen exprimiert. In *htl* mutanten Embryonen werden die longitudinalen Axone nicht durch die longitudinalen Gliazellen umhüllt, da sie einen vermutlich von axonaler Seite stammenden Liganden nicht empfangen können (Shishido et al., 1997). Ein vergleichbarer Phänotyp kommt in *loco* mutanten Tieren

zustande. *loco* codiert ein RGS Protein (Regulators of G-Protein Signaling) (Granderath et al., 1999). *tre 1*, welches - wie erwähnt - einen G-Protein gekoppelten Rezeptor codiert und sowohl bei Keimzellmigration in *Drosophila* als auch im Zebrafisch dort eine Rolle spielt, scheint oberhalb von *loco* zu wirken, da durch *tre 1* Expression der *loco* mutante Phänotyp gerettet werden kann (Schwabe et al. Vortrag im Rahmen der *Drosophila* Research Conference Washington 2004 mit dem Titel: *Dissecting a novel GPCR pathway involved in insulating the nervous system*).

Nrx und Gli sind Komponenten bzw. erforderlich für die Entwicklung der Zellkontaktzonen, der Septate Junctions (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996; Schulte et al., 2003). In Mutanten werden die sensorischen und motorischen Axone nicht korrekt durch Gliazellen von der Hämolymphe abgeschirmt. Die neuronale Reiztransduktion ist aufgrund der hohen K⁺-Konzentration der Hämolymphe nicht möglich, und die Tiere sind paralysiert. Etablierung einer korrekten, selektiven Diffusionsbarriere durch die Gliazellen ist also unabdingbar. *draper* ist ein Homolog des C.elegans Gens *ced1* (*cell corpse engulfment gene*). Es konnte demonstriert werden, daß über *draper* analog die Entsorgung apoptotischer (neuronaler) Zellkörper geschieht. Zudem scheint *draper* eine weitere Funktion zu besitzen: Draper ist verstärkt auf den glialen Membranen, die die Motoneurone umhüllen, zu finden und hypomorphe Allelkombinationen führen zu paralysierten Larven, wie sie auch z.B. in *gli* Mutanten beobachtet werden, so daß *draper* zusätzlich an der Aufrechterhaltung der Motoaxonphysiologie beteiligt sein könnte (Freeman et al., 2003).

1.4 Gliamigration in *Drosophila*

Nach der Determination und einhergehend mit der terminalen Differenzierung müssen einige Subtypen glialer Zellen im embryonalen Nervensystem von *Drosophila* migrieren, um ihre finalen Positionen zu erreichen. Gliazellen verfolgen dabei stereotype Routen: die longitudinalen Gliazellen migrieren in Richtung Mittellinie, die Nerve Root Gliazellen orientieren sich umgekehrt weg von dieser, Mittelliniengliazellen migrieren zwischen anteriore und posteriore Kommissur und die peripheren Gliazellen wandern – im ZNS geboren – in die Peripherie und legen damit die größte Distanz zurück. Migration glialer Zellen findet nicht nur im Embryo

statt. In der Augenimaginalscheibe von *Drosophila* Larven des dritten Larvalstadiums migrieren die sog. Retinobasalgliazellen (RBG) von ihrem Entstehungsort entlang des optischen Stiels in die Augenimaginalscheibe ein (Choi and Benzer, 1994; Hummel et al., 2002; Rangarajan et al., 2001; Rangarajan et al., 1999).

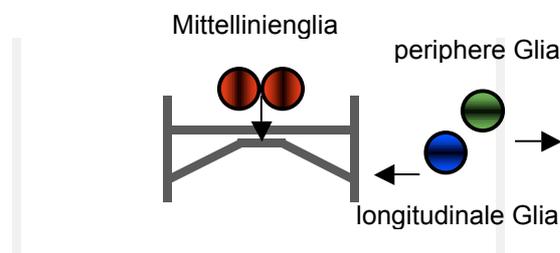


Abb. 6: Migrationsrichtungen von Gliazellen

Schematisch in grau ist das frühe ZNS dargestellt. Pfeile indizieren die Migrationsrichtungen

1.4.1 Migration der Mittelliniengliazellen

Im embryonalen ZNS wird anfangs nur die anteriore Kommissur angelegt. Erst nach dem Kontakt mit den Zellfortsätzen der Mittelliniengliazellen projizieren die ersten kommissuralen Axone auch in die posteriore Kommissur. Beide Kommissuren werden in direkter Nähe zueinander angelegt und sind nur durch die Axone der VUM Mittellinienneurone und die Fortsätze der Mittelliniengliazellen getrennt. Die Mittelliniengliazellen orientieren sich entlang der Axone der VUM Neurone in den interkommissuralen Raum, der dadurch expandiert. Durch diese interkalierende Migration werden anteriore und posteriore Kommissur separiert (Klämbt et al., 1991).

Ausfall von *spitz*, *pointed* oder *rhomboid* Genfunktion führt im ZNS zu einem Phänotyp fusionierter Kommissuren, da die Mittelliniengliazellen teilweise fehlen oder ungenügend differenziert wurden. In *wrapper* mutanten Embryonen ist die terminale Differenzierung betroffen und auch hier sind die Kommissuren fusioniert. Etwa 20 Loci konnten aufgedeckt werden, die bei Verlust der jeweiligen Gene ebenfalls in einem solchen Phänotyp resultieren (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Diese fungieren entweder auf glialer Seite oder sie wirken auf Seiten der VUM Neurone, die das Substrat der Mittelliniengliamigration darstellen. In diesem

Zusammenhang wurde *kette*, bzw. dessen Produkt, bereits als Homolog des Hem-2/Nap1 Proteins (Nck-associated Protein 1) identifiziert. In *kette* mutanten Embryonen weist das ZNS axonale Projektionsdefekte der VUM Neurone auf (Hummel et al., 2000). Weitere Studien ergaben, daß Kette an der Regulation des F-Aktinzytoskeletts beteiligt ist, einer Grundvoraussetzung von axonaler Zellmotilität (Bogdan and Klambt, 2003).

1.4.2 Migration der longitudinalen Gliazellen

Die Konnektive des ZNS formieren sich durch ipsilateral projizierende Pionierneurone und die longitudinalen Gliazellen. Der longitudinale Glioblast teilt sich und die Gliazellen migrieren in ventraler Richtung bis sie (mit einer gewissen Distanz zur Mittellinie) die Zellkörper der Pionierneurone kontaktieren. Folgend migrieren die longitudinalen Gliazellen vor und in engem Kontakt zu den Wachstumskegeln der Axone und bleiben schließlich an markanten Positionen stehen, die entweder für weitere Axonlenkung oder Faszikelbildung eine Rolle spielen, was sich auch nach der Etablierung des ersten longitudinalen Faszikels weiter fortsetzt (Hidalgo and Booth, 2000).

Wie bei der axonalen Wegfindung scheint eine transiente Expression von Robo in den longitudinalen Gliazellen diese kurz vor der Mittellinie stoppen zu lassen (Kinrade et al., 2001). In dem Moment, wenn Gliazellen die Axone kontaktieren, ist Robo nicht länger für eine Repression der Migration verantwortlich, sondern es sind vielmehr trophische Zellinteraktionen und Kontakte, die longitudinale Glia in ihren lateralen Positionen verbleiben lassen (Hidalgo, 2003; Hidalgo and Booth, 2000; Hidalgo and Brand, 1997; Kinrade et al., 2001).

1.4.3 Migration der peripheren Gliazellen

Anders als die glialen Zellen des ZNS, müssen periphere Gliazellen relativ weit migrieren, um die finalen Positionen zu erreichen. Dies macht sie zu einem sehr gut geeigneten Modell, um Migration zu untersuchen, da abberante gliale Positionen

leicht erkannt werden und axonale Defekte zudem Aufschlüsse über Fehlmigrationen geben können. Fast alle peripheren Gliazellen werden im ZNS geboren. Sie leiten sich hauptsächlich von den NB 1-3 und 2-5 ab und migrieren früh während der Embryogenese zum lateralen Rand des Bauchmarks (Ito et al., 1995; Klämbt and Goodman, 1991; Schmidt et al., 1997). Sie variieren in der Gesamtzahl von sechs bis acht. In späten Stadien der Embryogenese findet sich eine assoziiert mit dem SN, der Rest reiht sich entlang den Trakten des ISN auf.

Der Wachstumskegel des aCC Neuron (das Pionierneuron des ISN) navigiert im Stadium 12 auf die erste periphere Gliazelle zu. An diesem Punkt stellt die Gliazelle ein intermediäres Ziel für das Axon dar. In der weiteren Entwicklung wird diese Situation umgekehrt, da die peripheren Gliazellen dann den axonalen Trakten zu folgen scheinen (Sepp et al., 2000). Nach Proliferation verbleiben die peripheren Gliazellen zunächst in einer Gruppe an der ZNS/PNS Übergangszone.

Ab Stadium 13 folgen die Gliazellen mit ihren cytoplasmatischen Fortsätzen voran stets den Axontrakten der SN und ISN (Sepp et al., 2000; Sepp et al., 2001). Zu Beginn scheinen sie sich hierbei an der Kombination sensorischer und motorischer Axone zu orientieren, während sie später sensorische Axontrakte als Migrationssubstrat zu bevorzugen scheinen (Sepp et al., 2000). Mit voranschreitender Migration steigt auch der Grad an Expansion der peripheren Gliazellen und Umhüllung der Axone durch diese bis im Stadium 17 dieser Prozeß fast abgeschlossen ist. Lediglich ein distal gelegener Bereich scheint nicht durch *repo*-positive Gliazellen umhüllt zu werden (Sepp et al., 2000).

Wie schon für andere gliale Zellen beschrieben, existieren reziproke Interaktionen zwischen PNS Neuronen und peripheren Gliazellen (Sepp and Auld, 2003a; Sepp et al., 2001). Über die Kontrolle der Migration ist jedoch wenig bekannt. Über Aktin-GFP Markierung peripherer Gliazellen wurde gezeigt, daß diese als kontinuierliches Band von Zellen migrieren, wobei besonders die äußerste filopodienähnliche, F-Aktin enthaltene Projektionen besitzt. Mittels ektopischer Expression konnte gezeigt werden, daß die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 unterschiedliche Aufgaben während der Migration peripherer Gliazellen besitzen

(Sepp and Auld, 2003b). Über Faktoren, die F-Aktindynamik als integralen Bestandteil von Zellmotilität weiter kontrollieren bzw. regulieren, ist nichts bekannt.

1.5 Ziel der Arbeit

Untersucht werden sollte die Entwicklung der peripheren Gliazellen. Um Gene zu identifizieren, die an der Differenzierung und Migration dieser beteiligt sind, sollten verschiedene genetische Ansätze verfolgt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

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

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

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

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18 g Agar/500 ml H ₂ O autoklavieren, 150 ml H ₂ O zugeben, aufkochen, 3 ml Eisessig zugeben.
Araldit	52 ml Araldit Cy 212 und 48 ml Araldit Hy 964 (Härter) für 1 h mit einem Glasstab rühren, anschließend tropfenweise 2ml Araldit Dy 964 (Beschleuniger) zugeben, in 10ml Spritzen aliquotieren und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C lagern.
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid

Bleihydroxydlösung	12,5 g NaOH 5 g Kaliumnatriumtartrat auf 50 ml mit H ₂ O auffüllen (Stocklösung), davon 0,5 ml auf 100 ml H ₂ O verdünnen und erhitzen. 1 g Bleimonoxid hinzugeben, abkühlen lassen, filtrieren und auf pH 12,3 einstellen.
Chrom-Alaun-Gelatine	150 ml H ₂ O und 1,5 g Gelatine 1 h bei Zimmertemperatur quellen lassen, weitere 150 ml H ₂ O auf 60 °C erwärmen und mischen, nach vollständiger Lösung 0,15 g Chrom-Alaun zugeben.
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O ü. N. lösen und autoklavieren.
<i>Drosophila</i> Standardmedium (pro Liter Leitungswasser)	8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt 41 g Rübensirup hinzugeben, auf 60 °C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Eßlöffel Nipagin hinzugeben.
EM Fixative	
Glutaraldehyd (Vorfixierung)	50%ige Stammlösung wird auf 18,5 % in PBS verdünnt.

Osmiumfixans (Simultanfixierung)	2 % Glutaraldehyd, 1 % OsO ₄ in Phosphatpuffer (pH 7,0)
Epon	Epon I: 31 ml Epon 812 und 50 ml DDSA Epon II: 50 ml Epon 812 und 44,5 ml MNA (Härter) gebrauchsfertige Eponlösung (7:3) 21 ml Epon I 9 ml Epon II 0,45 ml DMP 30 (Beschleuniger)
Ethidiumbromid	10 mg/ml (Stocklösung) davon 4 µl/100ml Agarosegel
Gelladepuffer (10 x)	4 M Harnstoff 50 % Saccharose 50 mM EDTA Spatelspitze Xylencyanol Spatelspitze Bromphenolblau
Heptan-Fixans Glutaraldehyd (Antikörperfärbung)	4 % Glutaraldehyd in PBS 1:1 mit Heptan auffüllen, schütteln, nach Phasentrennung die gesättigte Heptanphase zur Fixierung verwenden. (kann wiederverwendet werden)
Hoyers Medium	50 ml H ₂ O und 30 g <i>Gummi arabicum</i> ü. N. rühren, 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben, verrühren und ggf. zentrifugieren.
Hybridisierlösung (<i>in situ</i>)	Hinzugabe von 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA zum Hybridisierungspuffer.

Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween 20
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA, 1,5 µg Helper-DNA (Laski et al., 1986), 1 µl Lebensmittelfarbe, 1,5 µl 10 x Injektionspuffer ad 15 µl H ₂ O
Injektionspuffer (10 x)	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/l Medium
Lysispuffer	0,1 M Tris pH 9 0,1 M EDTA 1 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
Natriumhypochloritlösung	10-15 % aktives Chlor (Chlorbleichlauge 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)

Neomycin (G418) Lösung	25 mg/ml in PBS lösen und ggf. mit Lebensmittelfarbe oder Bromphenolblau anfärben.
Neomycin <i>Drosophila</i> Futtermedium	Standardmedium in der Mikrowelle schmelzen, für die 19 A FRT Insertion 0,2ml Neomycinlösung pro 10 ml Standardmedium einrühren.
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
Phosphatpuffer, 1 M, pH 7,2	68,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 31,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄
Phosphatpuffer, 1 M, pH 7,4	77,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄
RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem H ₂ O
Ponceau S Färbelösung	3 % Essigsäure 0,3 % Ponceau S
SDS (10 %)	10 % Natriumdodecylsulfatlösung

SDS-Page

2 x SDS-Probenpuffer	0,125 M Tris-Cl 4 % SDS 20 % Glycerol 0,02 % Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol, auf pH 6,8 einstellen.
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgel 4 % (10ml)	1,33 ml Acrylamid-Lösung 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer 0,1 ml 10 % SDS 6 ml H ₂ O 100 µl 10 % APS 10 µl TEMED
Trenngel 10 % (30 ml)	10 ml Acrylamid-Lösung 7,5 ml 4 x Trenngelpuffer 0,3 ml 10 % SDS 12,1 ml H ₂ O 300 µl 10 % APS 20 µl TEMED
Elektrodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS, auf pH 8,3 einstellen.

SB Medium	35 g Trypton 20 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1l H ₂ O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
SOC Medium	2 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ autoklavieren, dann 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	50 mM Tris/HCl, pH 8,2 50 mM Borsäure 5 mM EDTA

TBS/Tween 20	20 mM Tris/HCl, pH7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,2 1 mM EDTA
Toluidinblaufärbelösung	1 % Toluidinblau und 1 % Borax je in H ₂ O davon werden: 500 µl Toluidinblau und 500 µl Borax zu 9 ml H ₂ O gegeben (Gebrauchslösung).
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.
Uranylacetat	2 % in H ₂ O

2.1.3 Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Herkunft
pBlueskript SK+	Standardklonierungen	Stratagene, Heidelberg
pGEM T-Easy	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Mannheim
pUAST	P-Element Transformationsvektor	(Brand and Perrimon, 1993)
pWIZ	Generierung von RNAi Konstrukten	(Lee and Carthew, 2002)
pWhspPT	P-Element Transformationsvektor	Derivat des pCaSpeR

		(Thummel et al., 1988)
pCaSpeRhs	P-Element Transformationsvektor	Derivat des pCaSpeR (Thummel et al., 1988)

2.1.4 Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
DH5 α	GIBCO/BRL, Eggenstein
XL1 blue	GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.5. Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Referenz/Herkunft
BP102	Maus	1:50	Patel & Goodman, unveröffentlicht
22C10 (anti-Futsch)	Maus	1:50	(Fujita et al., 1982)
anti- β -Galaktosidase	Kaninchen	1: 5000	Cappel
anti-Elav	Ratte	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-HRP-FITC (-Cy3; -Cy5)	Ziege	1:100	Dianova
anti-Repo	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Repo	Kaninchen	1:200	(Halter et al., 1995)
anti- β -Tubulin	Kaninchen	1:5000	(Kimble et al., 1989)
anti-Tango	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-GFP	Kaninchen	1:500	Böckers, unveröffentlicht
anti-Crooked Neck	Kaninchen	1:300	(Raisin-Tani and Leopold, 2002)

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

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

2.1.6 Verwendete Fliegenstämme

Im folgenden aufgelistet sind Stämme, die im Laufe der Arbeit verwendet wurden und größtenteils in den Legenden der Ergebnisdokumentation erwähnt werden. In dieser Arbeit generierte Stämme bzw. anderweitig benutzte Konstrukte und Stämme werden im Ergebnisteil aufgeführt.

2.1.6.1 Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>OregonR</i>	Wildtyp	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w</i>	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>y f v mal</i>	Ausgangsstamm X-chromosomale Mutagenese	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>w⁺::\square2-3, Ki, p^p/TM3</i>	Transposase	(Robertson et al., 1988)

3. Chromosom		
<i>TM2, Ubx</i>	Balancer 3. Chromosom	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>TM3^{bb}, Sb P[ry⁺, ftz-lacZ]</i>	Balancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>TM6^{bb}, Tb P[w⁺, Ubx-lacZ]</i>	Balancer 3. Chromosom	Vässin, unveröffentlicht
<i>w⁻; ; TM3, Sb/TM6B, Hu Tb</i>	Doppelbalancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w⁻; CyO/Sp; TM3/TM6B</i>	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>FM7c^{bb} P[ry⁺, ftz-lacZ]</i>	Balancer X Chromosom	Hiroimi, unveröffentlicht
<i>w⁻; CyO^{bb} P[ry⁺, elav-lacZ]/Sp; TM2/TM6B^{bb} P[w⁺, Ubx-lacZ]</i>	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>brk^{F124}/FM7c^{bb} P[ry⁺, ftz-lacZ]; CyO^{bb} P[ry⁺, ftz-lacZ]/Tft</i>	Doppelbalancer X/2. Chromosom	Lammel, unveröffentlicht
<i>brk^{F124}/FM7c^{bb} P[ry⁺, ftz-lacZ]; TM3^{bb}, Sb P[ry⁺, ftz-lacZ]/Scr</i>	Doppelbalancer X/3. Chromosom	Lammel, unveröffentlicht
<i>w⁻; Dr[Mio]/TM3, P{w[+mC]=GAL4-twi.G}, P{UAS-2xEGFP}, Sb, Ser</i>	GFP Doppelbalancer 3. Chromosom	Bloomington
<i>y,w,N/FM7c, P{w[+mC]=GAL4-twi.G}, P{UAS-2xEGFP}</i>	GFP Doppelbalancer X Chromosom	Bloomington

2.1.6.2 Mutationen, Enhancer trap Linien, Reporter- und FRT Konstrukte

Stamm	Beschreibung/Gen Lokalisation/Chromosom	Referenz/Herkunft
<i>tgo⁴</i>	<i>tango (tgo)</i> EMS Allel	3. (Sonnenfeld et al., 1997)
<i>tgo^{C8}</i>	<i>tango (tgo)</i> EMS Allel	3. (Hummel et al., 1999a)
<i>tgo^{3A1-042}</i>	<i>tango (tgo)</i> EMS Allel	3. (Hummel et al., 1999a)
<i>ss[aHR]</i>	<i>spineless (ss)</i> Allel	Bloomington

<i>crn</i> [yok-EH352]	<i>crooked neck (crn)</i> EMS Allel		Bloomington
<i>pointed</i> ^{□88}	transposaseinduziertes <i>pointed</i> Allel	3.	(Klämbt, 1993)
<i>tramtrack</i> ^{B330}	<i>tramtrack (ttk)</i> EMS Allel	3.	(Hummel et al., 1999a)
<i>N^{ts}</i>	temperatursensitives <i>Notch</i> (<i>N</i>) Allel	X	(Shellenbarger and Mohler, 1978)
<i>how</i> ^{E44}	<i>held out wing (how)</i> EMS Allel	3.	(Baehrecke, 1997)
<i>rA87</i>	Enhancer trap Insertion in <i>glia cells missing (gcm)</i>	2.	(Klämbt and Goodman, 1991)
<i>J29</i>	Enhancer trap Insertion in <i>gliotactin (gli)</i>	2.	(Klämbt and Goodman, 1991)
<i>tai</i> [k05809]	Enhancer trap Insertion in <i>taiman (tai)</i>	2.	Bloomington
<i>trh</i> [10512]	Enhancer trap Insertion in <i>trachealess (trh)</i>		Bloomington
<i>grh 2,5 – Su(H)x4-lacZ</i>	<i>su(H)lacZ</i> Reporter	3.	(Furriols and Bray, 2001)
<i>RrK-lacZ 6.3</i>	<i>loco</i> Reporter	3.	(Granderath et al., 2000)
<i>P{ryneoFRT}19A</i>	19 A FRT	X	Bloomington
<i>P{ryneoFRT}19A,</i> <i>P{w⁺tubPGAL80},</i> <i>P{ryhsFLP};</i> <i>P{w⁺UASmCD8GFP}</i>	MARCM-Set	X;2.	Bloomington

2.1.6.3 GAL4 Aktivatorlinien

Stamm	Expressionsmuster/ Promotor	Insertion/ Chromosom	Referenz/Herkunft
24B GAL4	<i>myosin-heavy chain</i>	3.	(Schuster et al., 1996)
<i>rho</i> GAL4	<i>rhomboid</i>	2. bzw. 3.	Ip and Levine, unveröffentlicht
<i>da</i> GAL4	<i>daughterless</i>	3.	(Wodarz et al., 1995)
<i>sim</i> GAL4	<i>single-minded</i>	2. bzw. 3.	(Scholz et al., 1997)
<i>sli</i> GAL4	<i>slit</i>	2.	(Scholz et al., 1997)
<i>elav</i> GAL4	<i>elav</i>	X	(Lin and Goodman, 1994)
<i>loco</i> GAL4	<i>loco</i>	2. bzw. 3.	(Granderath et al., 1999)
<i>sca</i> GAL4	<i>scabrous</i>	2.	(Hinz et al., 1994)
<i>dpp</i> GAL4	<i>decapentaplegic</i>	3.	Bloomington
GMR GAL4	<i>glass</i> Multimer Reporter	2.	(Ellis et al., 1993)
<i>ey</i> GAL4	<i>eyeless</i>	2.	Bloomington
<i>en</i> GAL4	<i>engrailed</i>	3.	Bloomington
<i>ptc</i> GAL4	<i>patched</i>	2.	Bloomington
<i>pnr</i> GAL4	<i>pannier</i>	3.	Bloomington
MZ97GAL4	periphere Glia	2.	(Ito et al., 1995)
MZ97GAL4	periphere Glia	2.	(Ito et al., 1995)
<i>repo</i> GAL4	<i>reversed polarity</i>	3.	(Sepp et al., 2001)
<i>sev</i> GAL4	<i>sevenless</i>	2.	Bloomington

2.1.6.4 UAS Effektorlinien

Stamm	Beschreibung/Gen □ Lokalisation/Chromosom □	Referenz
UAS <i>actin GFP</i>	<i>actin 5c GFP</i>	2. (Wolf et al., 2002)
UAS <i>N intra MHLS</i>	<i>Notch</i> intrazelluläre Domäne	3. Klein, unveröffentlicht
UAS <i>N ECN Xhol</i>	<i>Notch</i> extrazelluläre Domäne	2. Klein, unveröffentlicht
UAS <i>DI</i>	<i>Delta</i> cDNA	X Bloomington

UAS <i>tango</i>	<i>tango</i> cDNA	2.	(Sonnenfeld et al., 1997)
UAS <i>tango DN</i>	<i>tango</i> dominant Negativ (fehlende DNA Bindung)	2.	(Ohshiro and Saigo, 1997)
UAS <i>BTB-pnt</i>	Fusionskonstrukt: <u>P</u> nt <u>E</u> T <u>S</u> 1 Domäne mit <i>ttk</i> BTB/ <u>P</u> O <u>Z</u>	2.	Giesen, unveröffentlicht
UAS <i>pointedP2</i>	<i>pointedP2</i>	2.	(Brunner et al., 1994)

2.1.6.5 Duplikationen und Defizienzen

Zur Kartierung der drittchromosomalen Mutationen wurde das Bloomington Defizienzenkit für das 3. Chromosom (bis dato ca. 200 Stämme) verwendet. Die Duplikationen und Translokationen, die zur Kartierung der X-chromosomalen Mutationen verwendet wurden, sind in der nachfolgenden Liste aufgeführt:

Bloomington Stammnr.	Stammbeschreibung	Duplikationssegmente
901	<i>Df(1)svr, N[spl-1] ras[2] fw[1]/Dp(1;Y)y[2]67g19.1/C(1)DX, y[1] f[1]</i>	001A01;002B17-18 + 020A03;020Fh
761	<i>Dp(1;f)R, y[+]/y[1] dor[8]</i>	001A03-04;003A01-02 + 020A01;020Fh
1527	<i>Df(1)w258-45, y[1]/Y; Dp(1;3)w[vco]</i>	002B17-C01;003C05-06
936	<i>Df(1)64c18, g[1] sd[1]/Dp(1;2;Y)w[+]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]</i>	002D01-02;003D03-04 + 001B01;001B02 + 020B;020F + 021A01;022E04
1319	<i>Tp(1;2)w-ec, ec[64d] cm[1] ct[6] sn[3]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]</i>	003C01-02;003E07-08
5594	<i>Df(1)dhd81, w[1118]/C(1)DX, y[1] f[1]; Dp(1;2)4FRDup/+</i>	003C02;003F + 003F;004E03 + 020Fh;020Fh + 004E03;005A01-02;026D7
5279	<i>Df(1)JC70/Dp(1;Y)dx[+]5,</i>	004C11;006D08 +

	<i>y[+]/C(1)M5</i>	001A01;001B04
948	<i>Df(1)ct-J4, ln(1)dl-49, f[1]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;3)sn[13a1]/Ki[1]</i>	006C;007C09-D01
1879	<i>Df(1)GE202/Y; Dp(1;2)sn[+]72d/Dp(2)bw[D], bw[D] & C(1)A, y[1]/Y; Dp(1;2)sn[+]72d/Dp(2)bw[D], bw[D]</i>	007A08;008A05
5678	<i>Dp(1;Y)619, y[+] B[S]/w[1] otd[9]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]</i>	007D;008B03-D07 + 016A1;016A1 + 020B;020Fh
5292	<i>y[1] nej[Q7] v[1] f[1]/Dp(1;Y)FF1, y[+]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]</i>	008C-D;009B + 001A01;001B02
929	<i>Df(1)v-L15, y[1]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;2)v[+]75d/+</i>	009A02;010C02
5596	<i>Dp(1;Y)BSC1, y[+]/w[*] tsg[2]/C(1)RM, y[1] v[1]</i>	001A1;001B01-02 + 010C01- 02;011D03-08
3560	<i>Df(1)v-N48, f[*]/Dp(1;Y)y[+]v[+]#3/C(1)DX, y[1] f[1]</i>	009F04;010E03-04 + 001A01;001B02 + 020B;020Fh
5459	<i>C(1;Y)6, y[1] w[*] P{white- un4}BE1305 mew[023]/C(1)RM, y[1] pn[1] v[1]; Dp(1;f)y[+]</i>	011D-011F;012B07 + 001A01;001B02-12
3219	<i>C(1;Y)1, Df(1)g, y[1] f[1] B[1]/C(1)A, y[1]/Dp(1;f)LJ9, y[+] g[+] na[+] Ste[+]</i>	012A06-10;013A02-05 + 001A01;001B03-04
5270	<i>Df(1)19, f[1]/C(1)RM, y[1] shi[1] f[1]; Dp(1;Y)shi[+]3, y[+]</i>	013F01-04;014F04-06 + 001A01;001B02 + 016A1;016A1 + 020B;020Fh
5273	<i>Df(1)19, f[1]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;4)r[+]l</i>	013F01-04;016A01 + ? 001A01;1A ?
1537	<i>Dp(1;Y)W73, y[31d] B[1], f[+], B[S]/C(1)DX, y[1] f[1]/y[1]</i>	015B01-D;016F + 001A01;001B2 + 016A1;016A1

	<i>baz</i> [EH171]	+ 020A;020Fh + 020B;020Fh
1538	<i>Df(1)os</i> [UE69]/ <i>C(1)DX, y</i> [1] <i>f</i> [1]/ <i>Dp(1;Y)W39, y</i> [+] != <i>fcl</i> [+]Y	016F01-04;018A05-07 + 001A01;001B02 + 019E05- 07;020Fh
3033	<i>Df(1)R20, y</i> [1?]/ <i>C(1)DX, y</i> [1] <i>w</i> [1] <i>f</i> [1]/ <i>Dp(1;Y)y</i> [+] <i>mal</i> [+]	018F01;020Fh + 001A01;001B02

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Fliegenzucht

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

2.2.1.2 Sammeln von Embryonen

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

Für Massen-Eiablagen wurde das Färbesystem verwendet (Hummel et al., 1997). Dabei besteht ein Plexiglasblock aus Boden- und Deckelteil mit je 30 Bohrungen mit einem Durchmesser von 1,6 cm, die mit einer engmaschigen Gaze verschlossen werden. Boden- und Deckelteil zusammengesetzt bilden so 30 Ablagerörchen für Fliegenstämme. Der Block wird in eine CO₂-Kammer gestellt und die Fliegen werden mit Trichtern in die einzelnen Kammern eingefüllt und gleichzeitig narkotisiert. Der Block wird danach mit der anderen Hälfte verschlossen. Nach dem Erwachen der Fliegen wird die Gaze einer Seite von außen mit Bäckerhefe

bestrichen und der Block wird mit der bestrichenen Seite nach unten auf eine Apfelsaftagarplatte aufgesetzt. Die Eiablagen werden alle 12 h gewechselt, wobei nur die behefte Seite der Ablagen gegen eine neue getauscht wird. Die Hefe wird von den Ablagen mit kaltem Leitungswasser abgespült und die Ablagen werden maximal 2 Tage bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

2.2.1.3 Generierung von Rekombinanten zur klonalen Analyse

Das Prinzip wird anhand der in der Arbeit benutzten Stämme erläutert: Das zu rekombinierende, mutante X-Chromosom (*yfvml**) wird in der ersten Generation gegen einen *w⁻; P [ry] FRT19A* Stamm gekreuzt. Aus der resultierenden F1 Generation werden zehn jungfräuliche Weibchen, die heterozygot für die beiden beschriebenen Chromosomen sind gegen drei bis vier *FM7* Männchen gekreuzt. Diese Kreuzung wird auf Standardmedium für zwei Tage bei 25 °C gehalten. Folgend wird die Kreuzung auf Neomycinmedium umgesetzt und dort 24 h bei 25 °C belassen. Dieser Vorgang wird ca. viermal wiederholt, bis dann die adulten Tiere verworfen werden. Nur Tiere mit Neomycinresistenz überleben, die gleichzeitig die FRT Insertion tragen. Rekombinanten können anhand der Augenfarbe identifiziert werden. In Einzelkreuzungen werden Rekombinanten erneut gegen einen *FM7* Balancerstamm gekreuzt und aus den Nachkommen wird der Stamm etabliert.

Um zu testen, ob der etablierte Stamm weiterhin die X-chromosomale Mutation trägt, gibt es mehrere Möglichkeiten: Ist der Stamm letal, ist es wahrscheinlich, daß eine Letalmutation mit auf das FRT-Chromosom rekombiniert wurde. Zudem kann das Vorhandensein der Mutation durch eine Antikörperfärbung bestätigt werden, da die hier beschriebenen Allele zuvor aufgrund von Gliamigrationsdefekten im Embryo selektioniert wurden. Bei bereits bekannten Mutationen kann eine Kreuzung gegen „gerettete Männchen“, d.h. Männchen, in denen via einer Duplikation das mutierte X-Chromosom überlebt, ein Komplementationstest durchgeführt werden.

Zur Generierung von Klonen werden die rekombinierten Stämme gegen einen Stamm mit dem gleichen FRT (ohne Mutation) und einer Flipasequelle gekreuzt.

Wird eine *hs*-Flipase benutzt, sollten Ablagen der Kreuzungen zeitlich kontrolliert werden. Der Hitzeschock sollte im ersten Larvalstadium bei 38 °C im Wasserbad für 1 h gegeben werden, um Klone im adulte Auge zu erhalten.

2.2.1.4 Erzeugung neuer Konstruktinsertionen

Jungfräuliche Weibchen, Trägerinnen des jeweiligen w^+ -markierten Konstruktes (z.b. eines UAS Konstruktes), werden gegen Männchen des $\square 2-3$ -Stammes gekreuzt. Männliche Nachkommen, die sowohl das $\square 2-3$ -Chromosom als auch das UAS Konstrukt tragen, werden gegen Balancer-Weibchen ausgekreuzt. In der nächsten Generation werden solche Tiere selektioniert, die eine veränderte Augenfarbe (als Hinweis auf einen neuen Insertionsort) aufweisen und keine Transposase (Selektion gegen den *Ki* Marker) mehr besitzen. Diese werden in Einzelkreuzungen gegen Balancertiere etabliert.

2.2.1.5 EMS Mutagenese zur Isolierung X-chromosomaler Mutationen

3 bis 4 Tage alte, isogenisierte Männchen für ein nicht-letales, rezessiv markiertes X-Chromosom (*yellow*, *forked*, *vermillion*, *maroonlike*) wurden mit einer 25 mM EMS (Ethylmethansulfonat) Lösung nach der Methode von Lewis und Bacher (1968) behandelt. 50 mutagenisierte Männchen werden gegen ca. 150 *brk^{F124}/FM7c* jungfräuliche Weibchen gekreuzt. Diese Kreuzung wurde bei 25 °C zweimal im Abstand von je zwei Tagen auf frisches *Drosophila* Medium gesetzt, und danach wurde die Parentalgeneration verworfen. Aus der F1 Generation wurden einzelne, *FM7c* balancierte Weibchen, die gleichzeitig auch Trägerinnen des mutagenisierten X-Chromosoms sind, gegen *FM7c* Männchen gekreuzt. Aus diesen Einzelkreuzungen wurden Stämme etabliert. In der nachfolgenden F2 Generation können letale Mutationen anhand des Fehlens von männlichen Trägern des X-Chromosoms identifiziert werden. Stämme mit nicht-letal Mutationen wurden verworfen. (Kreuzungsschema der Mutagenese siehe auch Abb.17)

2.2.1.6 Bestimmung der Letalitätsphase

Fliegen eines zu untersuchenden Stammes werden gegen den Wildtypstamm OregonR ausgekreuzt. Die Nachkommen der F1 Generation (ohne Balancer) werden hinsichtlich ihrer Letalitätsphase untersucht. Dazu werden diese auf frische Apfelsaftagarplatten gesetzt, und die Ablage wird alle 12 h gewechselt. Anschließend wird die Ablage weitere 36 h bei 25 °C inkubiert und danach das Verhältnis von Embryonen zu geschlüpften Larven bestimmt. Bei einem ungefähren Verhältnis von 1:4 handelt es sich um eine embryonal letale Mutation.

2.2.1.7 Keimbahntransformation

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

2.2.1.7.1 Präparation der Embryonen

w^{1118} -Fliegen werden auf Apfelsaftagarplatten zur Ablage gesetzt. Die Platten werden ein- bis zweimal pro Stunde gewechselt und die Embryonen direkt zur Injektion verwendet. Zur Dechorioniesierung werden die Embryonen in 2,5 % NaOCl für 2 min inkubiert und dann - gründlichst mit Wasser gewaschen - auf einen Apfelsaftagarblock transferiert. Mit einer Präpariernadel werden die Embryonen in Reihen in einheitlicher Ausrichtung dort angeordnet. Sie werden anschließend mit einem mit Heptankleber beschichteten Deckglas aufgenommen und bis zu einem kritischen Punkt getrocknet. Dieser Punkt ist erreicht, wenn die Vitellinmembranen auf leichten Druck mit der Präpariernadel hin Falten werfen. Diese Embryonen werden dann sofort mit 10S Öl (Volltalef) überschichtet und für die Injektion verwendet.

2.2.1.7.2 Injektion der Embryonen

Embryonen und Injektionskanüle werden an einem Mikroskop in einer Ebene ausgerichtet. Injektionen erfolgen nur in Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm Stadium befinden. Die Kanüle wird in den posterioren Pol des Embryos gestochen und durch Betätigen der Injektionstaste des Transjektors wird eine kleine Menge des Injektionsmixes in den Embryo injiziert. Die erfolgreiche Injektion kann anhand der roten Farbe des Injektionsmixes nachvollzogen werden. Nach der Injektion wird das Deckglas in ein Wägeschälchen überführt und mit 3S Öl (Votalev) überschichtet. Die Embryonen werden bis zum Schlüpfen bei RT gehalten. Geschlüpfte L1 Larven werden mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila* Standardmedium überführt.

2.2.1.7.3 Selektion transgener Fliegen

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

2.2.1.7.4 Lokalisation der Insertionen

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

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Kutikulapräparation

Das balancierte, mutante Chromosom wird gegen den Wildtypstamm OregonR ausgekreuzt. In der folgenden Generation werden die Tiere ohne Balancerchromosom geselbstet und auf Ablage gebracht. Die Ablage wird alle 12 h gewechselt und weitere 48 h bei 25 °C inkubiert. Vor Inkubation streicht man an den Rand der Ablageplatte etwas Hefe, um alle lebensfähigen Larven dort zu konzentrieren und entfernen zu können. Anschließend werden alle braunen, d.h. toten Embryonen mit PBT von der Platte gewaschen. Nach chemischer Dechorionisierung (5 min in 50 % NaOCl) werden die Embryonen gewaschen und in einen Tropfen Hoyers Medium/Milchsäure (1:1) überführt, eingedeckelt und (wenn erforderlich) durch leichten Druck auf das Deckgläschen devitellinisiert. Zur Klärung werden die Kutikulapräparationen bei 65 °C ü. N. inkubiert.

2.2.2.2 *whole mount* Antikörperfärbung von *Drosophila* Embryonen

2.2.2.2.1 Antikörperfärbung von Einzelablagen

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

Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min

Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)

Trocknen auf Papierhandtüchern

Überführen der MWP in Heptan

Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml Glasröhrchen

Zugabe des gleichen Volumens an Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)

Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler

Abnahme der wäßrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol

Devitellinisierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln für ca. 20 sek

Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln

Abnahme des Methanols und einmaliges Waschen mit 96 % Ethanol

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Inkubation in 10 % Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler

Inkubation des primären AK (Antikörper) in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT ü. N. bei 4 °C auf einem Schüttler

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2-3 h bei RT auf einem Schüttler

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Antikörperspezifische Nachweisreaktionen folgen

2.2.2.2.2 Antikörperfärbung von Massen-Eiablagen (Hummel et al., 1997)

Entfernen der Hefe durch Waschen der Plexiglasbox mit Leitungswasser

Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min

Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)

Trocknen auf Papierhandtüchern

Überführen der Plexiglasbox in Heptanfix und Fixierung für 10-15 min

Überführen der Plexiglasbox in eine Schüttelbox mit Heptanfixans und Methanol (1:1)

Devitellinsierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln der verschlossenen Schüttelbox für ca. 20 sek

Waschen der Plexiglasbox in Methanol für ca. 20 sek, danach für ca. 1 min in 96 % Ethanol

Überführen der Plexiglasbox in PBT und gründliches Waschen mit PBT

Absaugen der Vitellinmembranen an der Oberfläche mit der Wasserstrahlpumpe

Umspülen der Embryonen mit Leitungswasser in eine flache Inkubationsschale

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Inkubation in 10 % GS/PBT (15 ml) für 1 h bei RT auf einem Schüttler

Inkubation des primären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT ü.N bei 4 °C auf einem Schüttler

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2-3 h bei RT auf einem Schüttler

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Antikörperspezifische Nachweisreaktionen folgen

2.2.2.2.3 Antikörperfärbung von Augenimaginalscheiben

Mit einer Pinzette wird am Mundhaken und mit einer zweiten Pinzette am hinteren Ende des vorderen Drittel einer L3 Larve angesetzt, und die Larve wird vorsichtig auseinandergezogen. Idealerweise erhält man die Mundhaken samt Augenimaginalscheiben (AIS), optischen Loben und ZNS. In diesem Verband sind die AIS schwer genug, um während der Waschschriffe abzusinken und gleichzeitig ausreichend für die Fixierung exponiert. Die so präparierten Scheiben werden auf Eis in PBS gesammelt.

Überführen der AIS in Reaktionsgefäße mit Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)

Fixierung in 4 % Formaldehyd/PBS für 20-30 min bei RT auf einem Schüttler

Abnahme des Fixans und Waschen dreimal kurz mit PBS

Waschen dreimal für 20 min in PBT auf einem Schüttler

Fortführung des Protokolls siehe Antikörperfärbung an Embryonen (ab: Inkubation in 10% GS/PBT)

Nach der antikörperspezifischen Nachweisreaktion werden die AIS in entsprechende Medien eingebettet. Dann erst werden die eigentlichen AIS mittels Präpariernadeln ausgerichtet und von dem übrigen Geweben getrennt. Wenn die

optischen Loben mit untersucht werden, sollten die Präparate mit „Füßchen“, d.h. kleinen Deckglasscherben oder Knete als Abstandhalter zwischen Objektträger und eigentlichem Deckgläschen eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt werden.

2.2.2.3 Antikörperspezifische Nachweisreaktion

2.2.2.3.1 Alkalische Phosphatase (AP) Färbung

Waschen der Embryonen zweimal 5 min in NBT Puffer auf einem Schüttler

Inkubation in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT-Puffer

Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Überführen der Embryonen in 70 % Glycerin

2.2.2.3.2 Meerrettichperoxidase (HRP) Färbung

Waschen der Embryonen einmal kurz in PBT

Inkubation der Embryonen in 0,3 mg/ml DAB-Lösung in PBS und 1,5 µl/ml H₂O₂

Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Überführen der Embryonen in 70 % Glycerin

2.2.2.4 Präabsorption des anti- β -Galaktosidase Antikörpers

Fixierung der Embryonen wie bei der *whole mount* Antikörperfärbung

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

Inkubation in 10% GS/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler

Inkubation des anti- β -Galaktosidase AK (Verdünnung 1:500) in 10 % GS/PBT
ü. N. bei 4°C auf einem Schüttler

Sterilfiltration des Überstandes, bei 4°C lagern (größere Aliquots bei -20 °C
einfrieren) und bei Bedarf in einer Verdünnung von 1:10 einsetzen

2.2.2.5 whole mount in situ Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen

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

2.2.2.5.1 Fixierung der Embryonen

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

Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 5 min

Waschen mit Leitungswasser (mind. fünfmal)

Trocknen auf Papierhandtüchern

Überführen der MWP in Heptan

Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml
Glasröhrchen

Zugabe des gleichen Volumens an Fixans (4 bis 8 % Formaldehyd/PBS)

Fixierung der Embryonen für 30 min bei RT auf einem Schüttler (1. Fixierung)

Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol

Devitellinisierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln für ca. 20 sek

Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol
und kurzes Schütteln

Waschen der Embryonen mit 96 % Ethanol (nach diesem Schritt können die
Embryonen bis zu einer weiteren Verwendung in Ethanol bei -20 °C gelagert
werden)

2.2.2.5.2 Hybridisierung der Embryonen

Waschen zweimal 5 min in PBT

Inkubation in 95 °C – 100 °C heißem Wasser für 6 min, dabei zwei- bis dreimal invertieren

Inkubation für 15 min auf Eis

Waschen zweimal kurz in PBT

Fixierung für 20 min in 5% Formaldehyd/PBT bei RT auf einem Schüttler (2. Fixierung)

Waschen dreimal 2 min mit PBT

Waschen für 5 min mit PBT/Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1

Waschen für 5 min mit Hybridisierungspuffer

Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei 60 °C für mind. 80 min

RNA-Probe in 30 µl Hybridisierungslösung für 2 min bei 90° denaturieren, dann direkt auf Eis stellen

Abnehmen der Hybridisierungslösung von den Embryonen

Zugabe der denaturierten RNA-Probe, Inkubation bei 60 °C ü. N.

Waschen für 30 min in Hybridisierungspuffer bei 60 °C

Waschen für 30 min in Hybridisierungspuffer/PBT bei 60 °C

Waschen der Embryonen fünfmal 20 min mit PBT 60°C

Waschen für 10 min in PBT bei RT auf einem Schüttler

Inkubation mit anti Digoxigenin AP Antikörper/PBT (1:2000) für 2 h bei RT auf einem Schüttler

Waschen der Embryonen fünfmal 20 min mit PBT bei 60 °C

2.2.2.5.3 Nachweisreaktion

Waschen zweimal für 5 min in NBT Puffer auf einem Schüttler bei RT

Embryonen in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT Puffer inkubieren

Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist

Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT

Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

2.2.2.5.4 Einbetten der Embryonen

Entwässern der Embryonen in einer Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % Ethanol) für je 2 min

Ein Tropfen Kanadabalsam-Methylsalicylat (4:1) wird auf einen Objektträger gegeben

Embryonen werden in 100 % Ethanol in eine Pipette aufgenommen und zügig werden einige in die Mitte des Kanadabalsam-Methylsalicylat Tropfens plaziert und ggf. mit einer Präpariernadel schnell verteilt

Deckglas auflegen

2.2.2.6 Simultanfixierung von adulten Augen

Der Fliegenkopf wird mit einer Rasierklinge vom Körper abgetrennt und median gespalten. Die Augen werden in ein Gemisch aus 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 4 µl 50%igem Glutaraldehyd auf Eis überführt. Die Simultanfixierung der Augen erfolgt für 30 min durch Zugabe von 50 µl Osmiumtetroxid. Nach Entfernung des Fixans wird zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend werden die Augen in 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer und 50 µl Osmiumtetroxid für zwei Stunden nachfixiert. Danach wird einmal kurz mit ddH₂O gewaschen und entwässert über die Alkoholstufen 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % je 10 min und zweimal in 100 % Ethanol je 15 min. Nach dem letzten Entwässerungsschritt wird Ethanol durch Propylenoxid ersetzt und zweimal für 15 min inkubiert. Bis zum Propylenoxid werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Augen werden folgend in ein Propylenoxid-Araldit-Gemisch (1:1) überführt und ü.N. dort belassen. Die Gefäße sollten so abgedeckt werden, daß das Propylenoxid langsam entweichen kann. Vor der Einbettung sollten die Augen für ca. 8-12 Stunden in reinem Araldit inkubiert werden.

Mit Präpariernadeln werden die fixierten Augen auf den Boden einer mit Araldit gefüllten Einbettungsform überführt. Die Augen werden so ausgerichtet, daß die zu schneidende Fläche nah an dem äußeren Rand der Form und auf dem Boden

der Form zu liegen kommt, um die Schnittflächenausrichtung während des Aushärtens zu stabilisieren. Das Aushärten erfolgt bei 60 °C für 48 h.

2.2.2.6.1 Herstellung von beschichteten Objektträgern

Objektträger werden gründlich unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend zweimal in 96%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen werden sie kurz in 0,5%ige Gelatine getaucht, erneut getrocknet und in Präparatekästen staubfrei aufbewahrt.

2.2.2.6.2 Erstellung von Semidünnschnitten adulter Augen

Glasmesser werden aus Glasstreifen an einem Gerät zur Herstellung von Glasmessern gebrochen und ein Trog zum Auffangen der Schnitte wird angeklebt. Semidünnschnitte von 1 µm werden mittels Glasmesser an einem Ultramikrotom hergestellt, aufgefangen und in einem Wassertropfen auf einen Objektträger aufgelegt. Dieser wird auf eine Heizplatte gelegt, wodurch der Tropfen eintrocknet und der Schnitt sich gleichzeitig glattzieht. Die Toluidinblaufärbelösung wird filtriert, auf ca. 65 °C erhitzt und für 30-60 sek auf die erwärmten Schnitte getropft. Danach werden die Objektträger mehrmals mit Wasser gewaschen, und die Färbungsintensität wird unter dem Mikroskop abgeschätzt, bevor die Schnitte dann mit Araldit eingedeckelt werden können.

2.2.2.7 Fixierung von Embryonen zur elektronenmikroskopischen Analyse

Die Vorbereitung von Embryonen zur EM-Analyse wurde nach diesem Protokoll durchgeführt (Stollewerk et al., 1996):

2.2.2.7.1 Selektion und Vorfizierung

Embryonen werden mit PBT in MWP überführt mit 5 % NaOCl für 4 min dechorionisiert, dann gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Mutante Embryonen im gesuchten Entwicklungsalter werden mit Hilfe der GFP Expression der Balancertiere am Fluoreszenzmikroskop selektioniert. Es folgt die Überführung

der Embryonen in ein mit 1,5 ml Phosphatpuffer gefülltes, verschließbares Glasröhrchen (Gesamtvolumen etwa 5 ml).

Der Phosphatpuffer wird entfernt, und die Embryonen werden vorfixiert durch Zugabe von 1,5 ml 18,5 % Glutaraldehyd in PBS für 20 min bei RT und in die MWP zurückgebracht. Die MWP werden auf Papierhandtüchern getrocknet, um das Fixans zu entfernen. In Phosphatpuffer überführt, werden die Embryonen mit einem Tropfen Puffer auf einen Objektträger, der mit doppelseitigem Klebeband beschichtet ist, aufgebracht. Der Puffer wird mit Papierhandtüchern größtenteils entfernt. Es wird dann erneut ein Tropfen Phosphatpuffer auf die Embryonen gegeben, und die Embryonen werden mechanisch devitellinisiert.

2.2.2.7.2 Behandlung der Embryonen mit Acrolein

Vor der Simultanfixierung werden die Embryonen in 2 % Acrolein und 4 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) 30 min bei RT inkubiert.

2.2.2.7.3 Simultanfixierung

Fixierung der Embryonen erfolgt für 30 min in 2 % Glutaraldehyd und 1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) auf Eis. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer werden die Embryonen für eine Stunde in 2 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) fixiert. Die Embryonen werden fünfmal mit kaltem ddH₂O gewaschen und bei RT für 30 min in 2 % Uranylacetat inkubiert. Darauf werden die Embryonen zweimal mit ddH₂O gewaschen und 30 min bei RT in Bleihydroxid inkubiert. Anschließend wird dreimal mit ddH₂O gewaschen und die Embryonen werden über eine Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % je 3 min und zweimal in 100 % Ethanol) dehydriert, wobei bis zum letzten Schritt auf Eis gearbeitet wird. Das Ethanol wird ersetzt durch zweimaliges Inkubieren der Embryonen für je 10 min durch Propylenoxid. Zur Vorbereitung der Einbettung werden die Embryonen ü.N. in Gefäße mit einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon gegeben. Dabei müssen die Gefäße so abgedichtet werden, daß das Propylenoxid nur langsam entweichen kann. Nach 20-24 h werden die Embryonen in

eine Einbettungsform mit Epon gegeben und entsprechend der gewünschten Schnittebene orientiert. Das Aushärten des Epons erfolgt ü. N. bei 65 °C.

2.2.2.7.4 Herstellung Chrom-Alaun-Gelatine beschichteter Objektträger

Objektträger werden einige Tage in 100 % Ethanol eingelegt und dann in die Chrom-Alaun-Gelatine Lösung getaucht und anschließend getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung werden sie staubfrei aufbewahrt (siehe auch 2.2.2.6.1).

2.2.2.7.5 Schneiden

Ultradünnschnitte werden mit einem Diamantmesser hergestellt, auf Kupfernetzchen aufgelegt und mit Bleihydroxyd 15 min kontrastiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde

In ein eisgekühltes Reaktionsgefäß werden gegeben:

1 µg linearisierte Plasmid DNA (mit RNA Polymerasepromotoren)

2 µl 10 x DIG RNA Labeling Mix (Roche)

2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)

ad 18 µl RNase-freies ddH₂O

2 µl RNA Polymerase (SP6, T7 oder T3) (Roche)

Mischen und kurz abzentrifugieren

Inkubation für 2 h bei 37 °C

Zugabe von 2 µl DNaseI, RNase-frei, zur Entfernung der Template-DNA

Inkubation für 15 min bei 37 °C

Abstoppen der Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0

Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl EtOH (-20°C)

Mischen und bei -20 °C 2 h (oder -70°C 30 min) fällen

Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 12.000 g

Waschen mit 50 µl 70 % EtOH, trocknen und in 100 µl RNase-freiem H₂O aufnehmen

Einfrieren bis zur Verwendung bei –20 °C

2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen (XL-1blue oder DH5-alpha *Escherichia coli*)

Animpfen von zweimal 0,5 l LB Medium mit 10 ml einer frischen ü. N. Kultur

Inkubation im Schüttler bei 37°C (3-5 h) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6

Lagerung der Kultur 15-20 min auf Eis

Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C

Überstand verwerfen und Pellet in 1 l kaltem ddH₂O resuspendieren

Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C

Überstand verwerfen und Pellet in 0,5 l kaltem ddH₂O resuspendieren

Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendieren

Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C

Überstand verwerfen und Pellet in ca. 2 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca. 1-3 x 10⁸ Zellen/ml)

Aliquotieren der Suspension in je 50 µl Einheiten und sofort 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.

Auftauen kompetenter Zellen auf Eis

Mischen der 50 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA Menge

Überführen in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette

Einsetzen der Küvette in Gene Pulser (BIORAD)

Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellungen am Gene Pulser: Kapazität -25 µF, Spannung -1,8 KV, Widerstand -200 Ω)

Küvette schnell entnehmen und 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugeben

Inkubation im Schüttler bei 37 °C für 30 min

Ausstreichen auf einem geeigneten Selektionsmedium und bei 37 °C ü.N. kultivieren

2.2.3.4 DNA Restriktionen

Die DNA Restriktionen erfolgten gemäß Herstellerangaben (Roche).

2.2.3.5 Gelelektrophorese

Trennung der DNA Fragmente erfolgte bei 100 - 150 V durch Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen (0,8 bis 1,2 % in TBE) mit Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml H₂O davon 4 µl Ethidiumbromid-lösung/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 Agarosegelelektrophorese wurde bei niedriger Spannung durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen. Die Arbeiten wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen

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

2.2.3.8 Ligation von DNA Fragmenten

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

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

2.2.3.9 Mini-Präparation von Plasmid DNA

Animpfen von 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum zur Selektion) mit Einzelkolonien

Inkubation ü.N. bei 37 °C im Schüttler

Überführen von ca. 1,5 ml Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß, den Rest kühl lagern

Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 10 sek bei 13.000 rpm und den Überstand abnehmen

Zugabe von 400 µl STET zum Pellet und durch Vortexen das Pellet lösen

Kochen für 1 min, anschließend in einer Tischzentrifuge 7 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

Überstand zu 400 µl Isopropanol in ein neues Reaktionsgefäß schütten und 1 min invertieren

Fällung in einer Tischzentrifuge für 8 min bei 13.000 rpm

Pellet mit 70 % EtOH waschen

Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase-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 Präparationskit der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.11 PCR

2.2.3.11.1 Standard PCR

Für Standard Amplifikationen wurde entweder Plasmid DNA oder genomische DNA 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 ddH 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
TaqDNA 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 werden entsprechend variiert.

Standard-Temperaturprofil:

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

2.2.3.11.2 Abweichungen von der Standard PCR

Um PCR Fehler zu minimieren, wurde in einigen Fällen eine Proofreading DNA Polymerase, die Pwo (*Pyrococcus woesei*) Polymerase (Roche) eingesetzt. Hierzu wurden die Extensionzeiten pro Zyklus um 5 sek verlängert (z.B. Extensionszeit zu Beginn 1:30 min – am Ende 3:25).

Da die Pwo Polymerase keine terminale Transferaseaktivität besitzt, können so erzeugte PCR Produkte nicht direkt in PCR Klonierungsvektoren ligiert werden, sondern es müssen Überhänge durch das sog. A-tailing angehängt werden.

Hierzu wird ein Ansatz aus:

1-7 µl des aufgereinigten PCR Produkts

1 µl 10 x PCR Puffer

dATP zur finalen Konzentration von 0,2 mM

5 units Pwo Polymerase

ad 10 µl dd steriles ddH₂O

für 15 bis 30 min bei 70 °C inkubiert.

2.2.3.12 Sequenzierung

Die meisten Sequenzierungen wurden mit dem Amersham Sequenzierungskit (*Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte mit

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

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten

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

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung und Vorbereitung von Proteinextrakten für die Gelelektrophorese

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte nach der Bradford-Methode. Hierzu wird das Bradfordreagenz 1:5 mit ddH₂O verdünnt. 1 bis 10 µl der zu testenden Lösung werden mit je 1 ml des Reagenz gemischt und nach 10 min Inkubationszeit photometrisch gemessen (Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm). Pro Gelspur sollten etwa 20 µg Protein aufgetragen werden. Die erforderliche Menge wird mit Probenpuffer und ddH₂O auf 15 µl aufgefüllt und 10 min im Wasserbad bei 90 °C denaturiert. Vor dem Gelauftrag werden die Proben 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

2.2.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

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

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

2.2.4.4 Western-Blotting und Immunodetektion von Proteinen

Der Proteintransfer von SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Tank-Blot-Einheit der Firma Hoefer gemäß Herstellerangaben. Die PVDF-Membran wird 10 sek in Methanol aktiviert, 5 min in ddH₂O gewaschen und für 7 min in Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer geschieht für 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA. Die Membran wird anschließend mit Ponceau S Lösung reversibel gefärbt, um signifikante Größen des Markers anzuzeichnen. Die Membran wird mit TBS Tween entfärbt und 1 h in 10 % Milchpulver geblockt. Der verwendete Antikörper wird in geeigneter Konzentration in 10 % Milchpulver verdünnt, und die Membran wird in dieser Lösung bei 4 °C ü.N. auf dem Rolltaumler inkubiert. Die Membran wird fünfmal 20 min in TBS Tween gewaschen und mit einem HRP gekoppelten Zweitantikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wird dieser fünfmal 20 min in TBS Tween heruntergewaschen. Das ECL-Western-Blotting-Detektionssystem der Firma Amersham wurde laut Herstellerangaben benutzt, um die Antigene nachzuweisen.

2.2.5 Zellkultur

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

2.2.5.1 Kultivierung von S2 Zellen

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

2.2.5.2 Antikörperfärbung an S2 Zellen

Um die Adhärenz der Zellen zu verbessern, wurden die Deckgläschen mit Fibronectin (1:100 in PBS) beschichtet. Die Saat der Zellen erfolgte in 24 Well Platten auf den beschichteten Deckgläschen mit 1×10^6 Zellen pro ml Medium. Die Zellen werden ü.N. bei 25 °C kultiviert. Nach Abnahme des Mediums erfolgt die Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (0,5 ml/Well) für 15 min. Die Zellen werden dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und dann 3 min mit 0,5% Triton X-100/PBS (1 ml/Well) permeabilisiert. Es folgt zweimaliges Waschen mit PBS für 5 min und Blocken für 1 h in 3 % BSA in PBS. Die Inkubation des primären Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 3 % BSA in PBS geschieht für 2 h bei RT (300µl/Well). Dieser wird anschließend dreimal für 10 min mit PBS heruntergewaschen. Der sekundäre Antikörper (1:100 bis 1:2000) in 3 % BSA in PBS folgt für 1 h bei Raumtemperatur. Danach werden die Deckgläschen mit PBS dreimal für 5 min gewaschen, einmal mit ddH₂O gewaschen und umgekehrt in entsprechendes Medium auf einem Objektträger eingebettet.

2.2.5.3 Transfektion von S2 Zellen

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

100 μ l Schneiders Medium,

2 μ l Fu Gene 6s/ μ g DNA,

je 0,5 μ g der zu transfizierenden DNA (z.B. UAS Konstrukt und *actGAL4* mischen und zugeben).

15 min bei RT stehen lassen.

Nach Abnahme des Überstands werden 100 μ l des Transfektionsansatzes mit 400 μ l Schneiders Medium pro Well zugegeben und ü.N. bei 25 °C inkubiert. Danach wird der Überstand durch Schneiders Medium ersetzt, und die Zellen können am folgenden Tag gefärbt werden wie zuvor beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Migration peripherer Gliazellen

3.1.1 Klassifikation und Verteilung der peripheren Gliazellen

Die korrekte Migration von Gliazellen ist eine Voraussetzung für die Entwicklung und Funktionalität von Nervensystemen. Um diesen Prozeß analysieren zu können, bedarf es eines geeigneten Modellsystems. Die Verteilung der peripheren Gliazellen und ihre Lokalisation an den axonalen Trakten des peripheren Nervensystems eines Stadium 16 Embryos wurde zunächst anhand von anti-Repo Färbungen und der Enhancer trap Insertion *J29*, einer Insertion in das Gen *gliotactin*, im Wildtyp untersucht (Abb.7). Der anti-HRP Antikörper erlaubt die Markierung neuronaler Strukturen des ZNS und PNS. Das Schema in Abb.7B verdeutlicht das Verhältnis Repo und *J29* positiver Zellen zueinander. Die Nomenklatur der dorsolateralen und ventralen peripheren Gliazellen wurde übernommen von V. Auld (Sepp et al., 2000). Die peripheren Gliazellen von *Drosophila* weisen verschiedene Charakteristika auf, die es zu einem gut geeigneten System machen, um gliale Entwicklung und Migration zu untersuchen: 1. Innerhalb des Nervensystems sind es die Gliazellen, die über die verhältnismäßig größte Distanz migrieren. 2. Die Anzahl der peripheren Gliazellen im Wildtyp ist invariabel. 3. Sowohl die Migration als auch die Positionierung dieser Zellen verläuft sehr stereotyp.

Diese drei Eigenschaften erlauben die Durchführung des genetischen Ansatzes, der Mutationen identifizieren soll, in denen der Verlust eines Gens die Differenzierung und das Migrationsverhalten von Gliazellen beeinflusst. Differenzierungsdefekte in mutanten Tieren können durch den Vergleich zu wildtypischen Gliazellen bestimmt werden. Die peripheren Gliazellen sind eine Gruppe von acht bis zehn Gliazellen (Abb.7, (Sepp et al., 2000)). Über eine anti-Repo Färbung, welche (neben anderen) alle peripheren Gliazellen markiert, ist es relativ schwierig, in einem großen Maßstab unter diesem Aspekt Mutanten zu sichten. Die Enhancer trap Insertion *J29* markiert vier der peripheren Gliazellen (Abb.7). Änderungen dieser „übersichtlichen“ Anzahl können gut erkannt werden und sind ein erster Hinweis auf mögliche Differenzierungsdefekte.

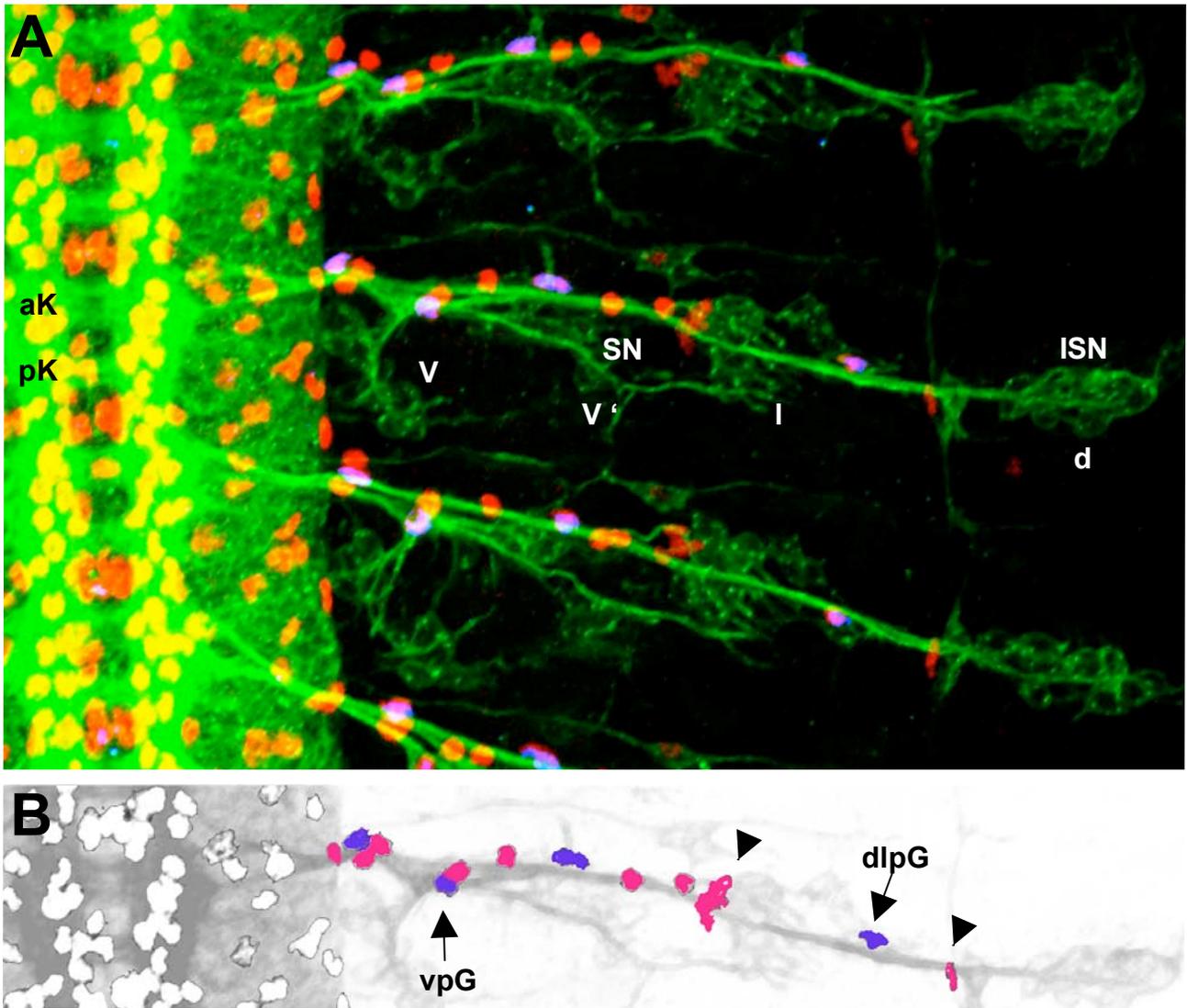


Abb.7: Klassifikation und Verteilung der peripheren Gliazellen im embryonalen Nervensystem von *Drosophila melanogaster*

A J29 Enhancer trap Insertion **B** Schema

Präparation des Nervensystems eines Stadium 16 Embryos; anterior ist oben, das ZNS ist links. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP in grün) und der Glíanuclei (anti-Repo in rot; anti- β -Galaktosidase - detektiert die J29 Expression - in blau). Die wildtypische Organisation der PNS Neurone sowie anteriore und posteriore Kommissur (**aK** und **pK**, **SN** Segmentalnerv, **ISN** Intersegmentalnerv, **d** dorsale, **I** laterale, **v'** und **v** ventrale Gruppen) eines abdominalen Hemisegments sind in **A** dargestellt. Acht bis zehn periphere Gliazellen befinden sich an den motorischen und sensorischen Axonen der Hauptaxontrakte des PNS (rot und blau). Zusätzlich besitzen die sensorischen PNS Neurone spezialisierte, unterstützende Zellen (Pfeilköpfe **B**). Die dorsolaterale periphere Gliazelle (dlpG; Pfeil **B**) und die ventrale periphere Gliazelle (vpG; Pfeil **B**) sind in dem Subset der peripheren Gliazellen der J29 Enhancer trap Insertion (blau) enthalten.

Zudem markiert die *J29* Expression solche Gliazellen, die nach erfolgter Migration an prägnanten Positionen der Migrationsstrecke lokalisiert sind: Die ventrale periphere Gliazelle ist die einzige, die später die Axone des Segmentalnervs umhüllen wird. Zwei weitere *J29* positive Gliazellen migrieren entlang des Intersegmentalnervs. Eine davon verbleibt am Startpunkt der Migration, der ZNS/PNS Übergangszone, während eine andere eine Position weiter dorsal, unterhalb der Chordotonalorgane einnimmt. Diese Spanne entspricht fast der gesamten Migrationsdistanz der peripheren Gliazellen. Die dorsolaterale periphere Gliazelle wird im PNS geboren. Die Lokalisation der *J29* positiven Gliazellen ist somit repräsentativ für das Migrationsverhalten der peripheren Gliazellen. Daher ermöglicht die *J29* Insertion die Migrationsanalyse sowohl der zurückgelegten Strecke als auch der finalen Positionierung der peripheren Gliazellen. Letzteres dient während der phänotypischen Analyse als hauptsächliches Kriterium zur Abschätzung von Migrationsdefekten.

Diese Abschätzung der Distanz der einzelnen Gliazellen zueinander ist möglich dadurch, daß die Markierung der Zellen durch die *J29* Insertion nucleär ist. Die Position der Nuclei dient als erstes Kriterium, um auf die Gesamtzellen zu schließen und Abstände dieser zueinander überhaupt erkennen zu können. Im Vergleich zur cytoplasmatischen Ausdehnung der Gliazellen ist so nur ein geringer Anteil der Zelle sichtbar (vgl. Abb.7 mit 9 und 10).

3.1.2 Migration der peripheren Gliazellen

Um mutante Embryonen analysieren zu können, sollte der wildtypische Migrationsablauf anhand der *J29* Expression genau charakterisiert werden. Dazu muß der Fortschritt der Migration mit den Stadien der Embryonalentwicklung korreliert werden. Um das Alter der Embryonen definieren zu können und die ZNS/PNS Grenzregion zu markieren, wurde der Antikörper BP102 verwendet (Abb.8). Das Alter der in Abb.8 dargestellten Embryonen steigt von Stadium 12 (Abb.8A) bis Stadium 17 (Abb.8F). Die *J29 lacZ* Expression beginnt in den Stadien 12 bis 13 (Pfeilkopf Abb.8B) in einer Gliazelle und in den Subperineuralgliazellen (Pfeil Abb.8C). Die eigentliche Migration geschieht in einem relativ engen

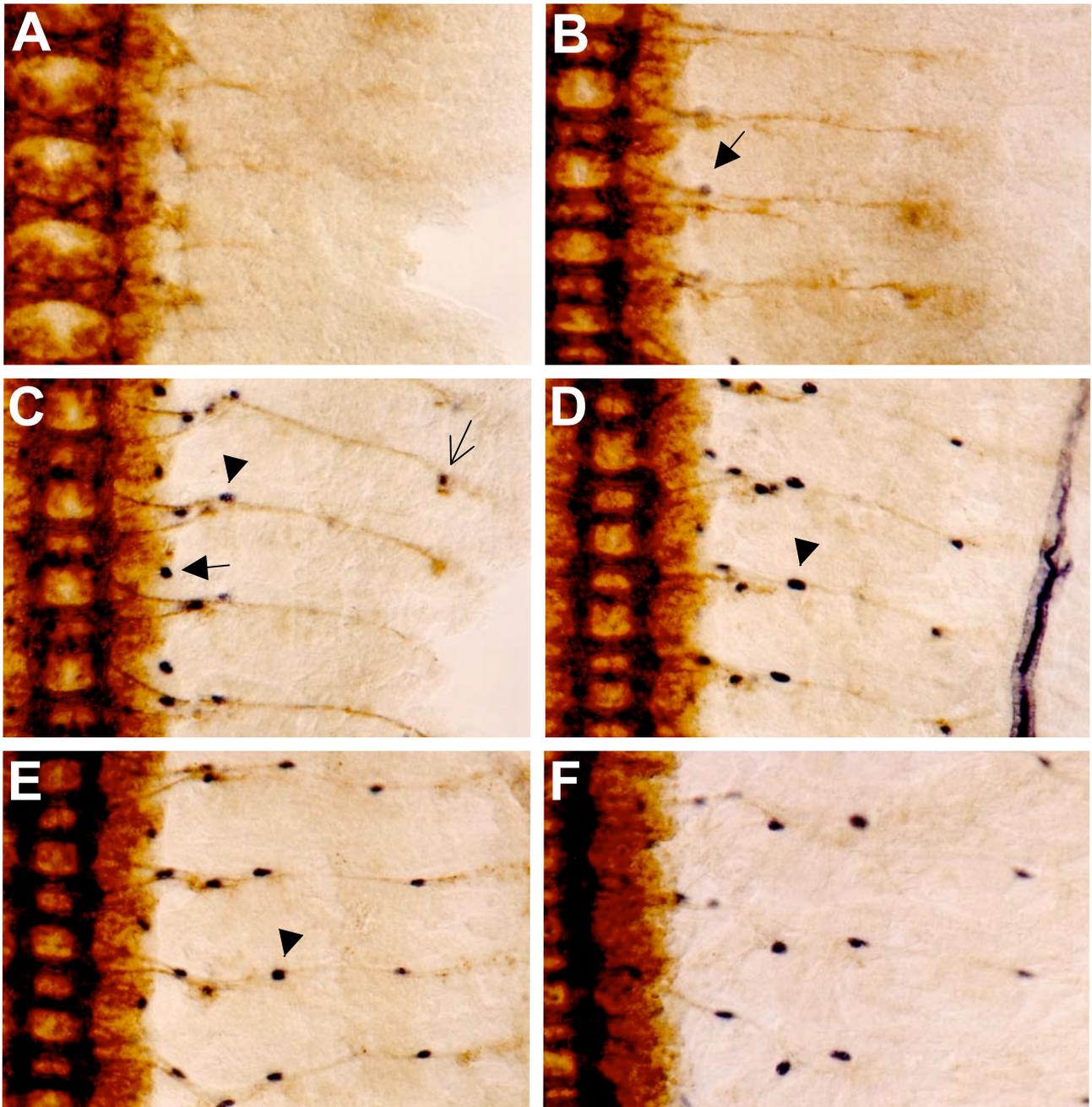


Abb.8: Migration peripherer Gliazellen

A Stadium 12 **B** Stadium 13 **C** Stadium 14 **D** Stadium 15 **E** Stadium 16 **F** Stadium 17

Präparationen der Nervensysteme von Embryonen unterschiedlicher Altersstadien; anterior ist oben, das ZNS ist links. Analyse der Migration peripherer Gliazellen mit Hilfe der *J29* Enhancer trap Insertion und des mAb BP102. Durch Markierung der Axone des ZNS kann die ZNS/PNS Grenze identifiziert werden und so auch die Distanz, die die Gliazellen zurücklegen. Die *J29 lacZ* Expression beginnt im Stadium 12 bis 13 (Pfeil **B**) in einer Gliazelle und in den Subperineuralgliazellen (Pfeil **C**). In den Stadien 14, 15 und 16 ist die Migrationsaktivität am größten (vgl. Pfeilköpfe an der jeweils korrespondierenden Position in **C,D,E**). Expression des Reporters in der dorsolateralen peripheren Gliazelle, die im PNS geboren wird, ist ab Stadium 12 bis 13 zu finden (offener Pfeil **C**).

Zeitfenster, in den Stadien 13 bis 16 (Pfeilköpfe in Abb.8C,D, und E). Die Expression des Reporters in der dorsolateralen peripheren Gliazelle beginnt ab den Stadien 12 bis 13 (offener Pfeil Abb.8C). Generell migrieren die Zellen kontinuierlich, v.a. in späteren Stadien einen regelmäßigen Abstand zueinander haltend (vgl. Abb.8E und F).

3.1.3 Umhüllung der Axone durch Gliazellen

Die Umhüllung der Axone durch Gliazellen zur Abschirmung der Axone gegen die Hämolymphe beginnt schon vor Termination der Migration der peripheren Gliazellen (Daten nicht gezeigt) und ist im Stadium 16 fast abgeschlossen (Abb.9, (Sepp et al., 2000)). Mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems und konfokaler Mikroskopie wurde zunächst der Wildtyp analysiert. Die cytoplasmatischen Fortsätze der Gliazellen wurden mit UAS*actin*GFP und dem Aktivatorstamm *MZ97* GAL4, der ektopische Expression in einem Subset von peripheren Gliazellen ermöglicht, sichtbar gemacht und mittels anti-Repo und anti-HRP Färbung gliale Nuclei und Axone. Obwohl die GAL4 Linie Expression in nur einem Subset der Gliazellen induziert, ist zu erkennen, daß die peripheren Gliazellen die Axone bereits weit umschließen. Das Ausmaß der Umhüllung samt weitreichender cytoplasmatischer Ausläufer wird zudem durch die ventrale periphere Gliazelle deutlich (Pfeile Abb.9B). Repo-Färbungen belegen, daß entlang des Segmentalnervs nur eine periphere Gliazelle gibt. Der überwiegende Anteil des Segmentalnervs wird somit einzig durch diese Zelle lückenlos umhüllt.

Eine höhere Auflösung und Präparation eines Fragments eines embryonalen Nervensystems erlaubt die Detailansicht einer Gliazelle samt Axon (Abb.10). Migration von Zellen bedeutet eine dynamische (da in einem engen Zeitfenster ablaufende) Umstrukturierung von Aktinbündeln. Durch die Benutzung des *actin*GFP Effektors wird eine ungleichmäßige, lückenhafte Verteilung der GFP markierten Strukturen auf den Axonen des Intersegmentalnervs (Pfeil Abb.10D) sichtbar. Der Hauptanteil vom Aktin ist um den Kern verteilt, die Zelle „verdünnt“ sich zu den Enden hin (Abb.10A und C). Die unterschiedliche Markierung zweier Gliazellen oder die Analyse der Zell-Zell-Kontakte könnten weiteren Aufschluß über das Ineinandergreifen peripherer Gliazellen und ihre Assoziation mit den Axonen geben.

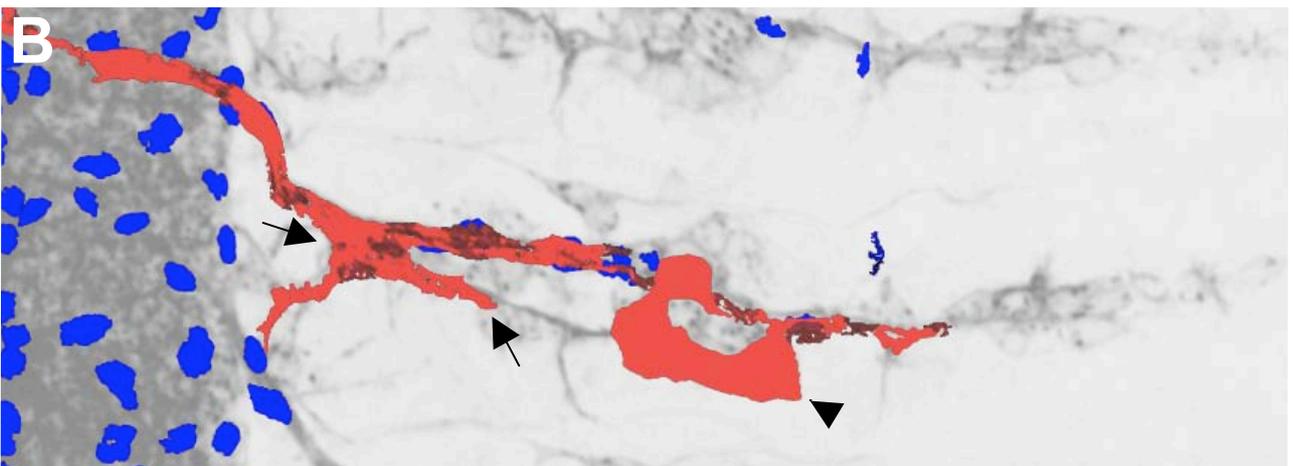
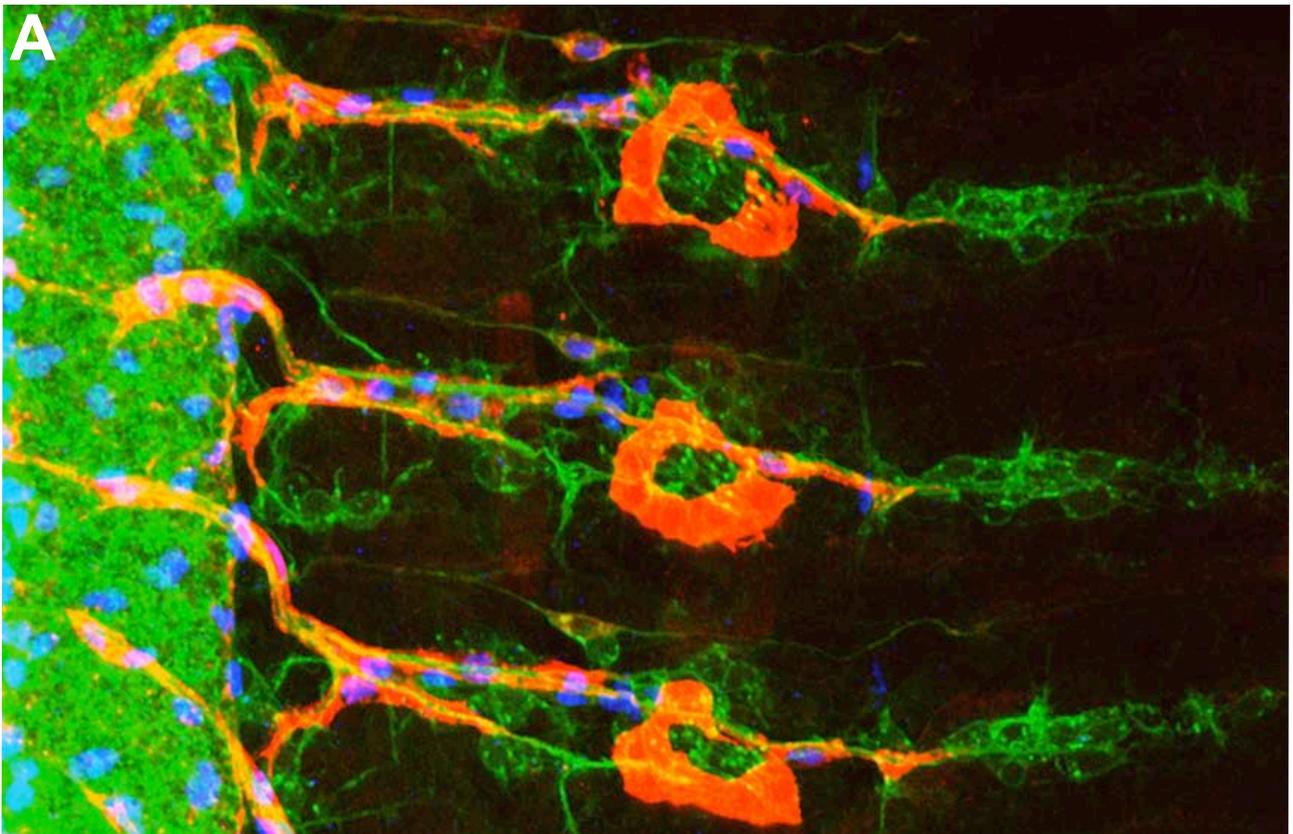


Abb.9: Umhüllung der Hauptaxontrakte des PNS durch periphere Gliazellen

A MZ97GAL4/UASactGFP **B** Schema

Präparation des Nervensystems eines Stadium 16 Embryos, anterior ist oben, das ZNS ist links. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP in grün), der Glianuclei (anti-Repo in blau) und eines Subsets der peripheren Gliazellen (anti-GFP in rot) mit ihren cytoplasmatischen Ausläufern.

In späten Stadien der Embryogenese beginnen die peripheren Gliazellen die Axone des PNS zu umhüllen. Das Ausmaß einer Zelle ist bei der ventralen peripheren Gliazelle (vPG) zu sehen, die als einzige am Segmentalnerv lokalisiert ist (Pfeile **B**). Die GAL4 Linie MZ97 induziert ebenfalls Expression in den Oenocyten (Pfeilkopf **B**).

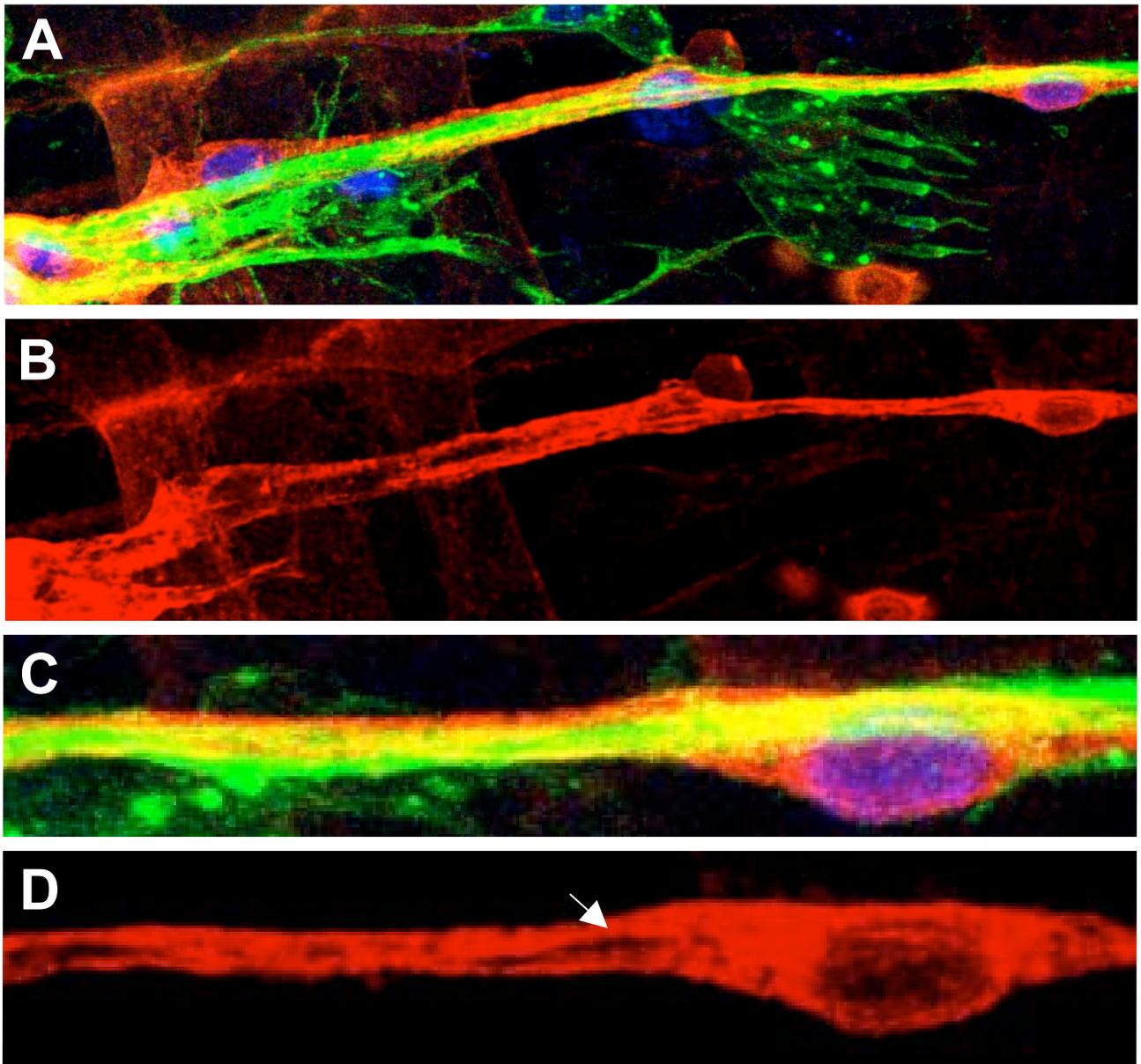


Abb.10: Detailansicht peripherer Gliazellen

A bis D *MZ97GAL4/UASactGFP* **C und D** Ausschnittsvergrößerung aus A

Präparation des Nervensystems eines Stadium 16 Embryos; anterior ist oben, das ZNS ist links. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP in grün), der Glia nuclei (anti-Repo in blau) und eines Subsets der peripheren Gliazellen (anti-GFP in rot) mit ihren cytoplasmatischen Ausläufern. Die gewählte Auflösung erlaubt eine Detailansicht der Umhüllung von Axonen durch periphere Gliazellen. Der Pfeil in **D** markiert eine ungleichmäßige Verteilung des *actGFP* innerhalb der Gliazelle.

3.2 Genetische Ansätze

Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Mittels einer EMS Mutagenese und eines neuartigen, repressorvermittelten Systems sollte die Sichtung von Mutanten ermöglichen, solche Gene zu identifizieren, die für die Entwicklung und Migration der peripheren Gliazellen gebraucht werden. Durch das neue System sollte eine mögliche Alternative zur EMS Mutagenese ausgetestet werden.

3.2.1 Expression einer *pointed-tramtrack* Chimäre führt zu einer *pointed* Phänokopie

Der Verlust der Gene *tramtrack* und *pointed* resultiert in beiden Fällen im embryonalen ZNS in fusionierten Kommissuren, da anteriore und posteriore Kommissur nicht mehr getrennt werden (Abb.11B und C). Durch die ektopische Expression des folgend BTB-*pnt* (POZ/BTB–ETS-Pointed) genannten Konstruktes, einer Fusion aus der DNA bindenden Domäne von Pointed und der Protein-Protein Interaktionsdomäne von Tramtrack, wird eine Phänokopie des *pointed* mutanten Phänotyps generiert (Abb.11D bis F (Edenfeld, 1999; Giesen, 2000)). Die DNA Bindungsdomäne von Pointed sollte spezifisch die *pointed* Zielgene erkennen. Die BTB/POZ Domäne, die transkriptionelle Repression vermittelt, reprimiert diese Zielgene, so daß die Chimäre bei ektopischer Expression in Geweben, die normalerweise auch *pointed* Transkripte exprimieren, als dominant Negativ zur *pointed* Genfunktion fungiert. Abhängig von der Expressionsdomäne wurden Phänotypen generiert, die neben fusionierten Kommissuren zu verdünnten Konnektiven und stark reduzierten Kommissuren führten (Abb.11B bis F). Die in Abb.11F gezeigten Phänotypen entsprechen wesentlich stärkeren Defekten *pointed* mutanter Embryonen.

Umgekehrt wurde versucht, den Repressor neuronalen Schicksals, Tramtrack, in einen Aktivator zu konvertieren. Ein Fusionskonstrukt aus der DNA bindenden Domäne von Tramtrack (Zn Finger) mit dem allgemeinen Transkriptionsaktivator VP16 wurde erstellt, in den pUAST Vektor inkloniert und via Keimbahntransformation in die Fliege gebracht. Die ektopische Expression dieses

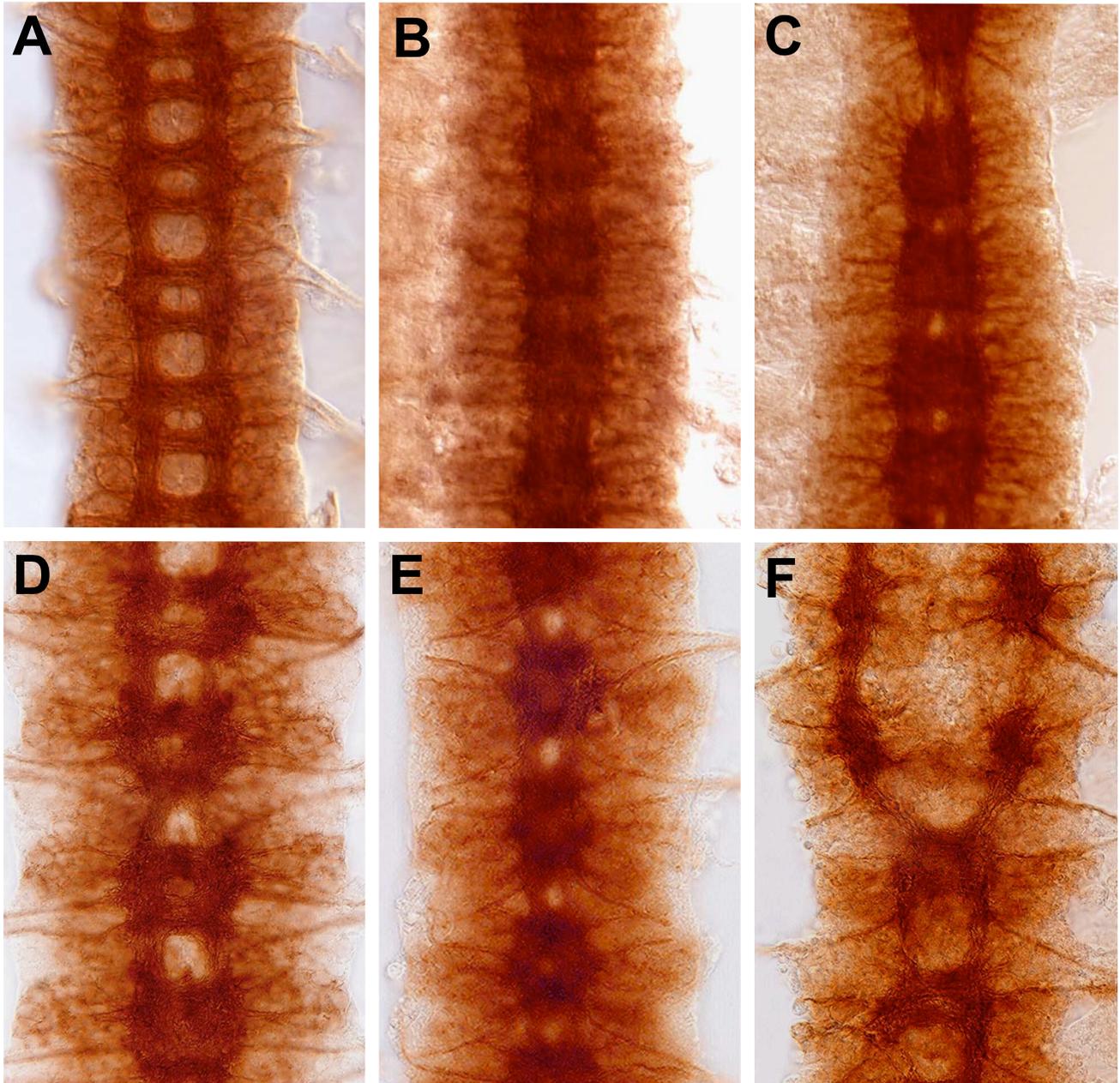


Abb.11: Vergleich durch ektopische Expression des BTB-*pnt* Konstruktes induzierter ZNS Phänotypen mit denen *tramtrack* bzw. *pointed* mutanter Embryonen

A Wildtyp **B** *ttk*^{B330} **C** *pnt*⁸⁸ **D** *slit*GAL4/UAS BTB-*pnt* **E** *rhomboid*GAL4/UAS BTB-*pnt* **F** *rhomboid*GAL4/ UAS BTB-*pnt*

ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. Analyse des axonalen Musters durch mAB BP102 und anschließende Immunhistochemie. Mutationen in *pointed* und *tramtrack* resultieren in fusionierten Kommissuren. Anteriore und posteriore Kommissur werden nicht mehr voneinander getrennt, sondern verbleiben in direkter Nachbarschaft (**A** und **B**). Die Expression des BTB-*pnt* Konstruktes in der ZNS Mittellinie generiert eine Phänokopie. Abhängig von der Wahl des Aktivators und der Stärke des Effektors (**D** bis **F**), treten stärkere ZNS Defekte auf (**E** bis **F**): verdünnte Konnektive und stark reduzierte Kommissuren.

Konstruktes in den unterschiedlichsten Geweben mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems erzielte in keinem der untersuchten Kontexte mutante Phänotypen - sowohl in embryonalen Stadien der Entwicklung als auch in adulten Stadien.

3.2.2 Ektopische Expression der *pointed-tramtrack* Chimäre in der Augenimaginalscheibe

Die ektopische BTB-*pnt* Expression in der Augenimaginalscheibe zeigte Defekte in der Rekrutierung der Photorezeptorzellen, aus denen später die Photorezeptoren des adulten Auges hervorgehen (Abb.12). Die Photorezeptorzellcluster am posterioren Rand der Augenimaginalscheibe bestehen zum Teil nur aus der Hälfte der wildtypischen Anzahl der Rezeptorneurone, die hier mittels des anti-Elav Antikörpers (kernständig) markiert wurden (Pfeil Abb.12B rechts). Sowohl die Orientierung als auch der Abstand dieser Cluster zueinander scheint gestört (vgl. Abb.12A und B).

Der hier benutzte zweite primäre Antikörper anti-HRP, erkennt ein neuronales Oberflächenepitop, welches u.a. alle Axone der Augenimaginalscheibe markiert (Pfeilkopf Abb.12B). Durch die Doppelfärbung mit den Antikörpern anti-Elav und anti-HRP wird deutlich, daß auch die mutanten Photorezeptorzellen Axone in den optischen Stiel entsenden (Abb.12B, (Edenfeld, 1999)). Die Verwendung des *sev* GAL4 Aktivators, der die Expression von BTB-*pnt* in den sich differenzierenden Photorezeptoren, Mystery- und Kegelzellen induziert, resultiert in keiner Abweichung vom Wildtyp. Die adulten Augen dieser Tiere jedoch zeigen einen Phänotyp unregelmäßiger Ommatidienanordnung (Abb.13), die Expression mittels GMRGAL 4 resultiert in ommatidienlosen Bereichen (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Das BTB-*pnt* Konstrukt wirkt als dominant Negativ zur *pointed* Genfunktion

Die Induktion von BTB-*pnt* im Auge mit Hilfe des *sev* GAL4 Aktivators in einfacher (Abb.13B) und doppelter Dosis (Abb.13C) führt zu charakteristischen Phänotypen im Komplexauge. Die regelmäßige Anordnung der Ommatidien ist gestört (vgl. Abb.13A und B,C), die Augen wirken „rauh“. Der mediane Bereich des

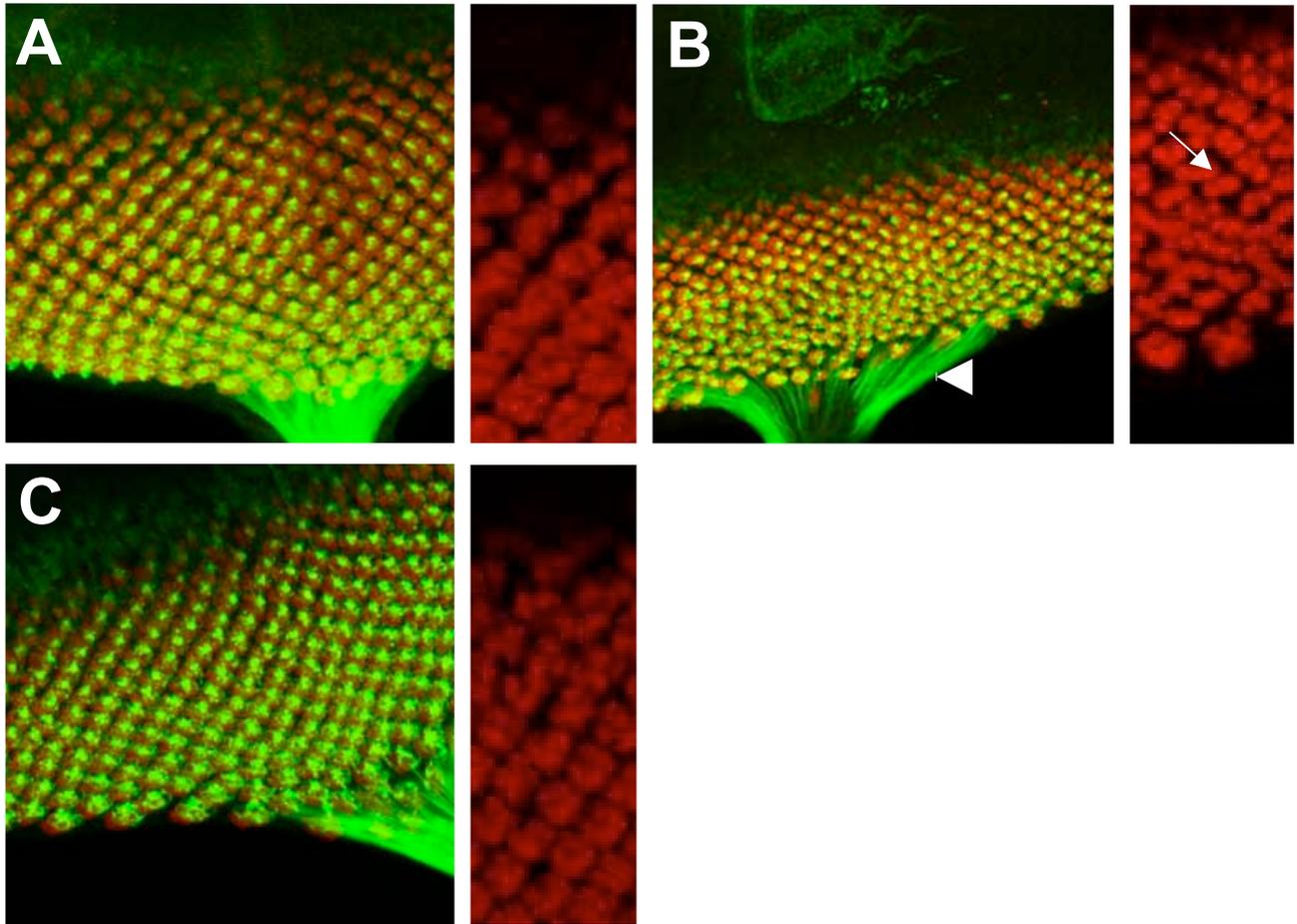


Abb.12: Ektopische Expression des Fusionsproteins *BTB-pnt* in der Augenimaginalscheibe

A Wildtyp **B** *GMRGAL4,UAS BTB-pnt* **C** *sevenless(sev)GAL4,UAS BTB-pnt*

Konfokale Analyse des neuronalen Musters in der Augenimaginalscheibe (axonal - anti-HRP in grün; nucleär - anti-Elav in rot). Die morphogenetische Furche zeigt nach oben, der Ansatz des optischen Stiels nach unten; Detailausschnitt der Photorezeptorcluster (anti-Elav) jeweils rechts im Bild. Nach Expression des *BTB-pnt* Proteins in allen Zellen posterior der morphogenetischen Furche werden die Cluster nicht mehr vollständig rekrutiert (Pfeil **B**) und auch der Abstand dieser zueinander weicht von der regelmäßigen wildtypischen Anordnung ab (vgl. **A** und **B**). Die mutanten Cluster besitzen Axone, die sich am posterioren Rand der Scheibe im optischen Stiel sammeln (Pfeilkopf **B**). Die Verwendung des *sevGAL4* Aktivators resultiert in keiner Abweichung vom Wildtyp in der Augenimaginalscheibe (**C**).

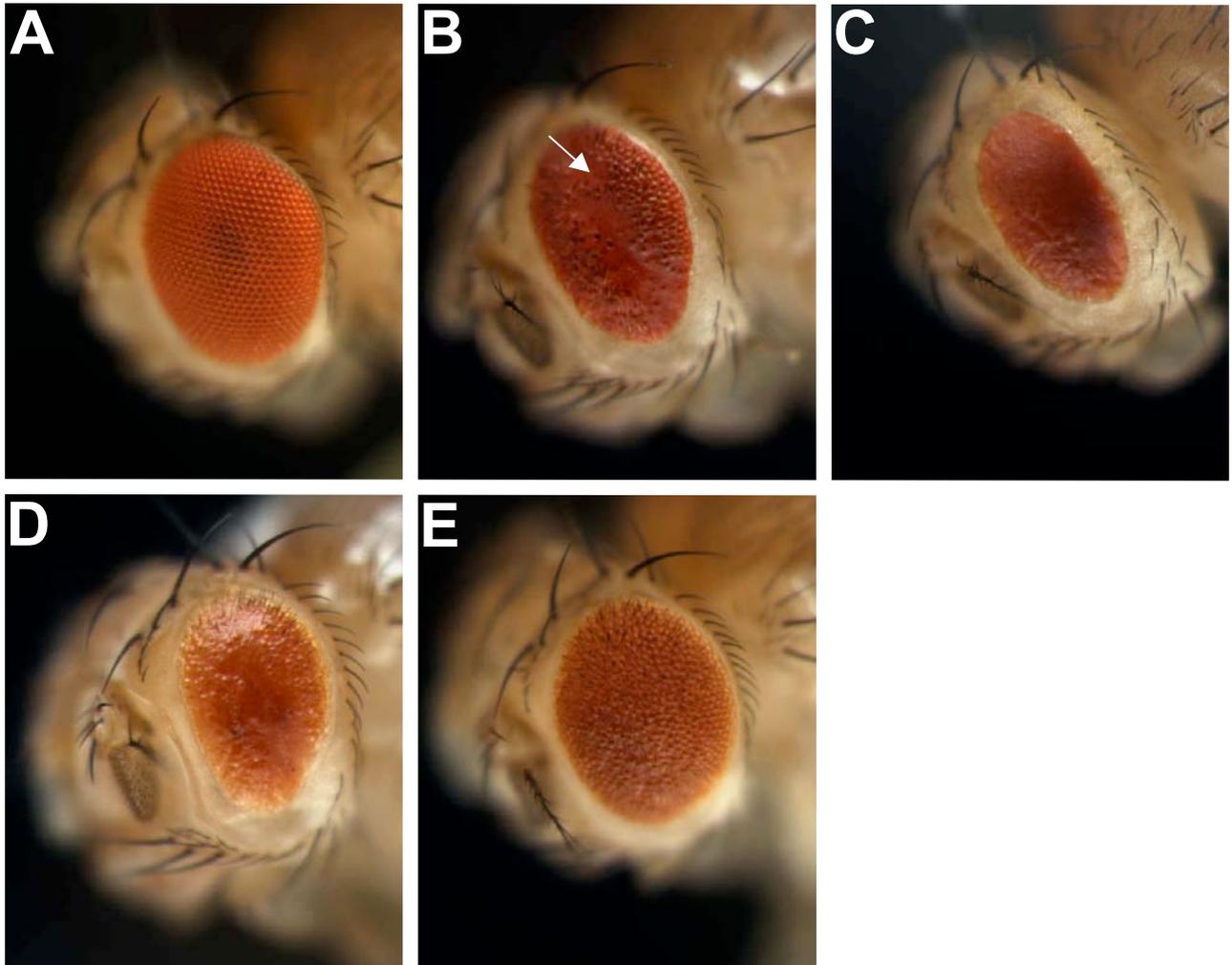


Abb.13: Adulte Augenphänotypen nach ektopischer BTB-*pnt* Expression

A Wildtyp **B** *sevenless(sev)*GAL4,UAS BTB-*pnt*/+ **C** *sev*GAL4,UAS BTB-*pnt*/*sev*GAL4,UAS BTB-*pnt* **D** *sev*GAL4,UAS BTB-*pnt*/*pnt*⁷⁸⁸ **E** *sev*GAL4,UAS BTB-*pnt*/*sev*GAL4,UAS *pnt*P2

Ansicht der Komplexaugen von lateral; dorsal ist oben. Expression von BTB-*pnt* im Auge mit Hilfe des *sev*GAL4 Aktivators in einfacher (**B**) und doppelter Dosis (**C**). Die regelmäßige Anordnung sowie die wildtypische Uniformität der Ommatidien (vgl. **A**) ist gestört („rauhe Augen“). Genetische Reduktion der endogenen *pointed* Dosis in dem Hintergrund der Situation dargestellt in **B** resultiert in einer Verstärkung des Augenphänotyps. Ektopische Expression von *pointedP2* bewirkt den gegenteiligen Effekt (**E**).

Auges (von dorsal nach ventral verlaufend) wirkt „glatt“, ohne Begrenzungen der Ommatidien, die entweder verschmolzen scheinen oder fehlen (Pfeil Abb.13B). Bei doppelter Dosis, d.h. mit zwei Kopien des UAS BTB-*pnt* Konstruktes ist dieser Bereich über die gesamte Augenfläche erstreckt (Abb.13C).

Durch die Expression des BTB-*pnt* Konstruktes in heterozygoten *pnt*^{Δ88} Tieren kann der Einfluß der endogenen *pointed* Dosis analysiert werden (Abb.13D). Dies führt zu einer deutlichen Verstärkung des Augenphänotyps (vgl. Abb.13B und D). Der Phänotyp ist somit spezifisch modifizierbar. Die ektopische Expression von *pointedP2* bewirkt den gegenteiligen Effekt. Der Phänotyp, der durch die Induktion des BTB-*pnt* Konstruktes entsteht, wird deutlich gemildert („gerettet“). Es sind keine ommatidienfreien Bereiche vorhanden, und das Auge erscheint wesentlich regelmäßiger (Abb.13E).

Semidünnschnitte der Retinae sollten Aufschluß darüber geben, ob sich die ektopische Expression des BTB-*pnt* Konstruktes auf zellulärer Ebene als *pointed* dominant Negativ verhält (Abb.14). Analog zu vitalen Kombinationen verschiedener *pointed* Allele fehlen bei niedriger Expression des BTB-*pnt* Konstruktes ein bis drei Photorezeptorzellen pro Ommatidium. Häufig ist die R7 Photorezeptorzelle abwesend (Abb.14B). Bei doppelter BTB-*pnt* Dosis fehlen fast alle Photorezeptoren (Abb.14C). Durch die genetische Reduktion endogener *pointed* Gendosis, wird der Phänotyp verstärkt (vgl. Abb.14B und D). Es resultiert ein Phänotyp, der etwas schwächer aber vergleichbar ist mit dem nach Expression der doppelten BTB-*pnt* Dosis (Abb.14C und D). Die Anzahl der Photorezeptoren ist stark reduziert. Es existieren photorezeptorlose Bereiche, in denen oft Pigmentreste zu erkennen sind. Wird zusätzlich zur ektopischen Expression von BTB-*pnt pntP2* ektopisch exprimiert, wird der Phänotyp deutlich abgeschwächt (vgl. Abb.14B und E). Die Ommatidien enthalten überwiegend wildtypische Photorezeptoranzahl.

Tabelle 1

Komponenten der Sevenless Signaltransduktionskaskade, UAS*pntP2* Konstrukte und mögliche Faktoren, die an BTB vermittelter Repression beteiligt sein könnten, wurden auf mögliche Modifikation des BTB-*pnt* induzierten Augenphänotyps

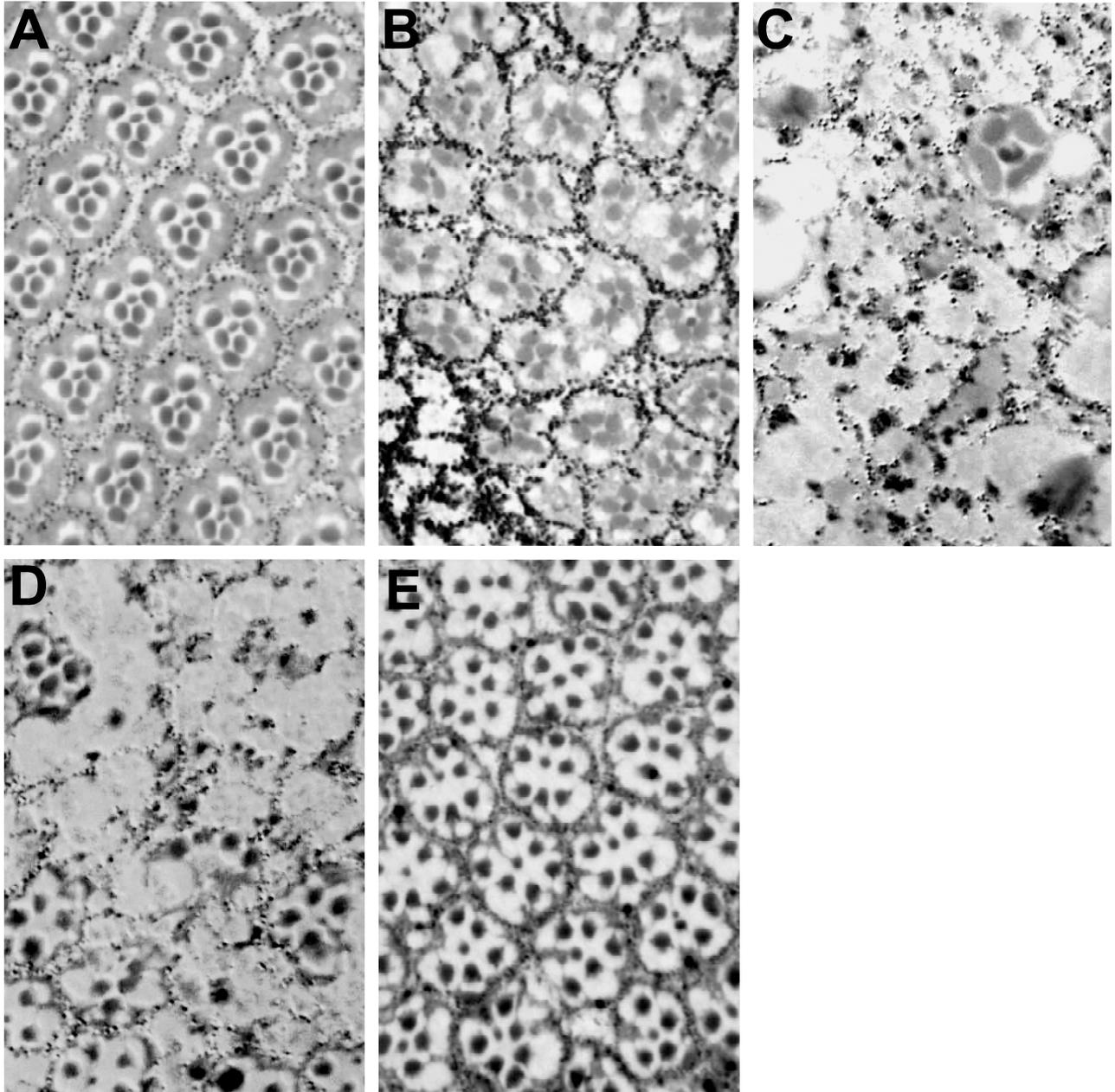


Abb.14: Effekte der BTB-*pnt* Expression auf die Sevenless Signaltransduktionskaskade

A Wildtyp **B** *sevenless(sev)GAL4,UAS BTB-pnt/+* **C** *sevGAL4,UAS BTB-pnt/sevGAL4,UAS BTB-pnt* **D** *sevGAL4,UAS BTB-pnt/pnt^{L88}* **E** *sevGAL4,UAS BTB-pnt/sevGAL4,UASpntP2*

Semidünnschnitte der Retinae von *Drosophila* in sagittaler Schnittebene. Induktion von BTB-*pnt* im Auge mit Hilfe des *sevGAL4* Aktivators in einfacher Dosis (**B**) und doppelter Dosis (**C**) resultiert in einem unterschiedlich starken Verlust von Photorezeptoren. Genetische Reduktion von endogenem *pointed* mit gleichzeitiger Expression von BTB-*pnt* im *sev*-Muster in **D** resultiert in einem intermediären Phänotyp zu (**B**) und (**C**). Durch die ektopische Expression von *pntP2* (**E**) wird der Phänotyp deutlich abgeschwächt (vgl. **B** und **E**).

untersucht.

<i>sev</i> GAL4,UAS BTB- <i>pntX</i>	Verstärkung + Abschwächung - kein Effekt .	<i>sev</i> GAL4,UAS BTB- <i>pnt</i> X	Verstärkung + Abschwächung - kein Effekt .
<i>sev</i> GAL4,UAS BTB- <i>pnt</i>	+	<i>dCtBp</i> ⁰⁴³⁶³	.
UAS <i>pntP2</i>	-	<i>DER</i> ^{Elp1}	.
<i>ttk</i> ^{B330}	.	<i>aos</i> ^{w11}	.
<i>sin3A</i>	.	<i>rl</i> ^{ea8}	.
<i>Rpd</i> ³⁰⁴⁵	.	<i>rl</i> ^{10A}	.
<i>pnt</i> ^{D2-26}	+?	<i>sev</i> ^{(d2)Ras1}	.
<i>pnt</i> ^{Δ88}	+	<i>top</i> ^{3c81}	.
<i>dCtBp</i> ^{87De10}	.	UASP2.TE.2 T151E	.
UASVP16R1(minusETS)	.	UASP2.5 T151A	.
UAS <i>pntP2Vp16XX</i>	-		

Aus der Tabelle geht hervor, daß der durch BTB-*pnt* induzierte Phänotyp spezifisch nur durch *pointed* Mutationen oder funktionelle UAS*pntP2* Konstrukte modifizierbar ist. Komponenten der Sevenless Kaskade, mögliche Cofaktoren der Histondeacetylase und *tramtrack* selbst haben keine deutlichen Auswirkungen. Über die Gene, die unterhalb von *pointed* wirken, ist wenig bekannt. In einem Modifierscreen könnte der dominante BTB-*pnt* Augenphänotyp dazu genutzt werden, solche Gene aufzudecken. In einem ersten Screen wurden etwa 100 drittchromosomale Defizienzen in Heterozygose zu einer *sev* GAL4 UAS BTB-*pnt* Rekombinante auf eine Modifikation des Phänotyps gesichtet. Unter diesen wurden keine eindeutigen Kandidaten gefunden.

3.2.4 Repression des *loco* Reporters durch BTB-*pnt*

Das BTB-*pnt* Konstrukt reprimiert die *lacZ* Expression des *Rrk-lacZ* 6.3 *loco* Reporterkonstruktes (Abb.15). Das Modell stellt die Promotorregion mit den Bindungsstellen für die Gene *glial cells missing* und *pointed* dar. BTB-*pnt* erkennt die *pointed* Bindungsstelle und reprimiert die *lacZ* Expression. Um dieses Modell zu

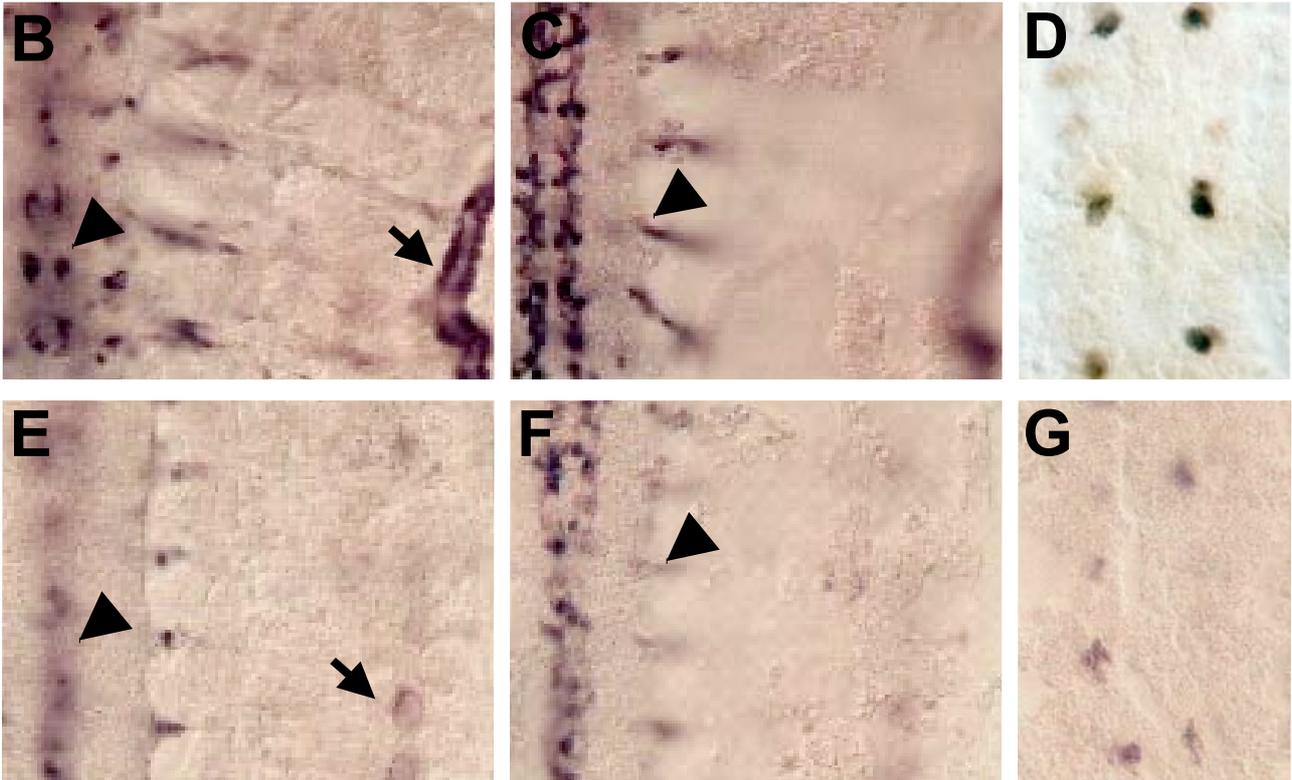
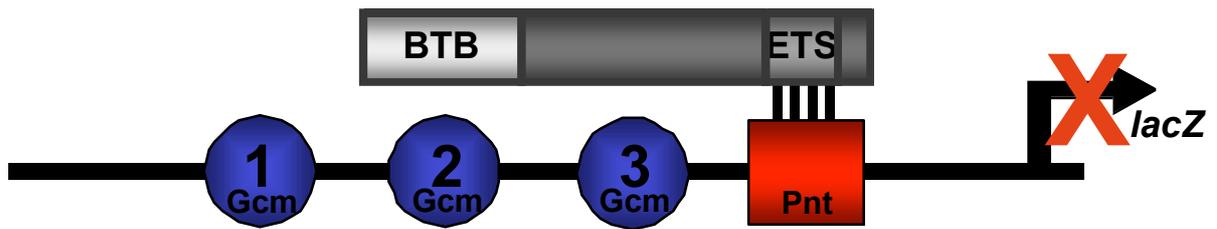
A

Abb.15: Ektopische Expression der BTB-*pnt* Chimäre reprimiert die *lacZ* Expression des *Rrk-lacZ 6.3 loco* Reporters

A Modell der BTB-*pnt* vermittelten Repression **B** *Rrk-lacZ 6.3/+* (ventralere Fokusebene) **C** *Rrk-lacZ 6.3/+* (dorsalere Fokusebene) **D** *Rrk-lacZ 6.3/+* (ZNS Aufsicht) **E** UAS BTB-*pnt/Rrk-lacZ 6.3/daughterless GAL4* (ventralere Fokusebene) **F** UAS BTB-*pnt/Rrk-lacZ 6.3/daughterless GAL4* (dorsalere Fokusebene) **G** UAS BTB-*pnt/Rrk-lacZ 6.3/daughterless GAL4* (ZNS Aufsicht)

Präparationen von Embryonen, anterior ist oben (**B,C,E,F** Stadium 16; **D** und **G** Stadium 11). Analyse der *Rrk-lacZ 6.3* Expression durch anti- β -Galaktosidaseantikörper und anschließende AP-Immunhistochemie. In Anwesenheit des BTB-*pnt* Proteins werden die β -Galaktosidaselevel des *loco* Reporters *Rrk-lacZ 6.3* in den peripheren und lateralen Gliazellen (Pfeilköpfe) als auch in den Tracheen (Pfeil) reduziert (vgl. **B,C,D** mit **E,F,G**). Mit ubiquitär ektopischer BTB-*pnt* Expression ist *lacZ* Färbung in weniger Glioblasten pro Hemisegment zu finden (vgl. **D** und **G**).

untersuchen, wurde die *Rrk-lacZ 6.3 loco lacZ* Expression nach ubiquitärer Expression des BTB-*pnt* Konstruktes untersucht (Abb.15E,F,G). Im Vergleich zur regulären *Rrk-lacZ 6.3* Expression (Abb.15 B,C,D) sind die *lacZ* Level in den peripheren und lateralen Gliazellen (Pfeilspitzen Abb.15E und F) als auch in den Tracheen (Pfeil Abb.15E) reduziert. Im Stadium 11 ist die *Rrk-lacZ 6.3* Expression in den sich teilenden longitudinalen Glioblasten zu erkennen (Abb.15D). Mit ubiquitärer ektopischer BTB-*pnt* Expression ist *lacZ* Färbung in weniger Glioblasten pro Hemisegment zu finden (Abb.15G). Das BTB-*pnt* Konstrukt reprimiert also spezifisch *pointed* Zielgene, wie an dem Beispiel für *loco* hier gezeigt werden konnte.

3.3 Versuche zur Etablierung eines Repressorsystems

Wie durch die vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, vermittelt die BTB Domäne im *BTB-pnt* Konstrukt eine Repression von *pointed* Zielgenen. Ein Mechanismus der transkriptionellen Repression via Zn-Finger-BTB/POZ Proteine geschieht über eine Rekrutierung von allgemeinen Cofaktoren wie SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptor). Über Histonedeacetylasen (HDAC) können dann histonmodifizierende Aktivitäten lokal auf das Chromatin ausgeübt werden und so eine Repression der Transkription bewirken (Abb.16A) (Huynh and Bardwell, 1998).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, sollte ein neues, genetisches System etabliert werden. Es sollten so Gene identifiziert werden, die für die Entwicklung und Migration der peripheren Gliazellen essentiell sind. Es wurden folgende Vorarbeiten geleistet: Die Klonierung der in Abb.16B schematisch dargestellten Konstrukte samt unterschiedlicher Promotoren sollte eine ubiquitäre Expression der BTB/POZ-GAL4 DB (DNA Bindungsdomäne) bzw. GAL4 DB-BTB/POZ Chimären erlauben (Abb.16B). Wie dargestellt, wurden solche Konstrukte kloniert und nach Keimbahntransformation die entsprechenden transgenen Stämme etabliert. Die benutzten Promotoren entstammten den entsprechenden Regionen der Gene *loco* und *ubiquitin* bzw. *heatshock* Promotoren. Die BTB Domäne mit unterschiedlich langen *tramtrack* cDNA Bereichen als Spacer zwischen GAL4 DNA Bindungsdomäne und BTB Domäne wurde in zwei unterschiedlichen Sets von Konstrukten fusioniert (Karten sind dem Anhang .

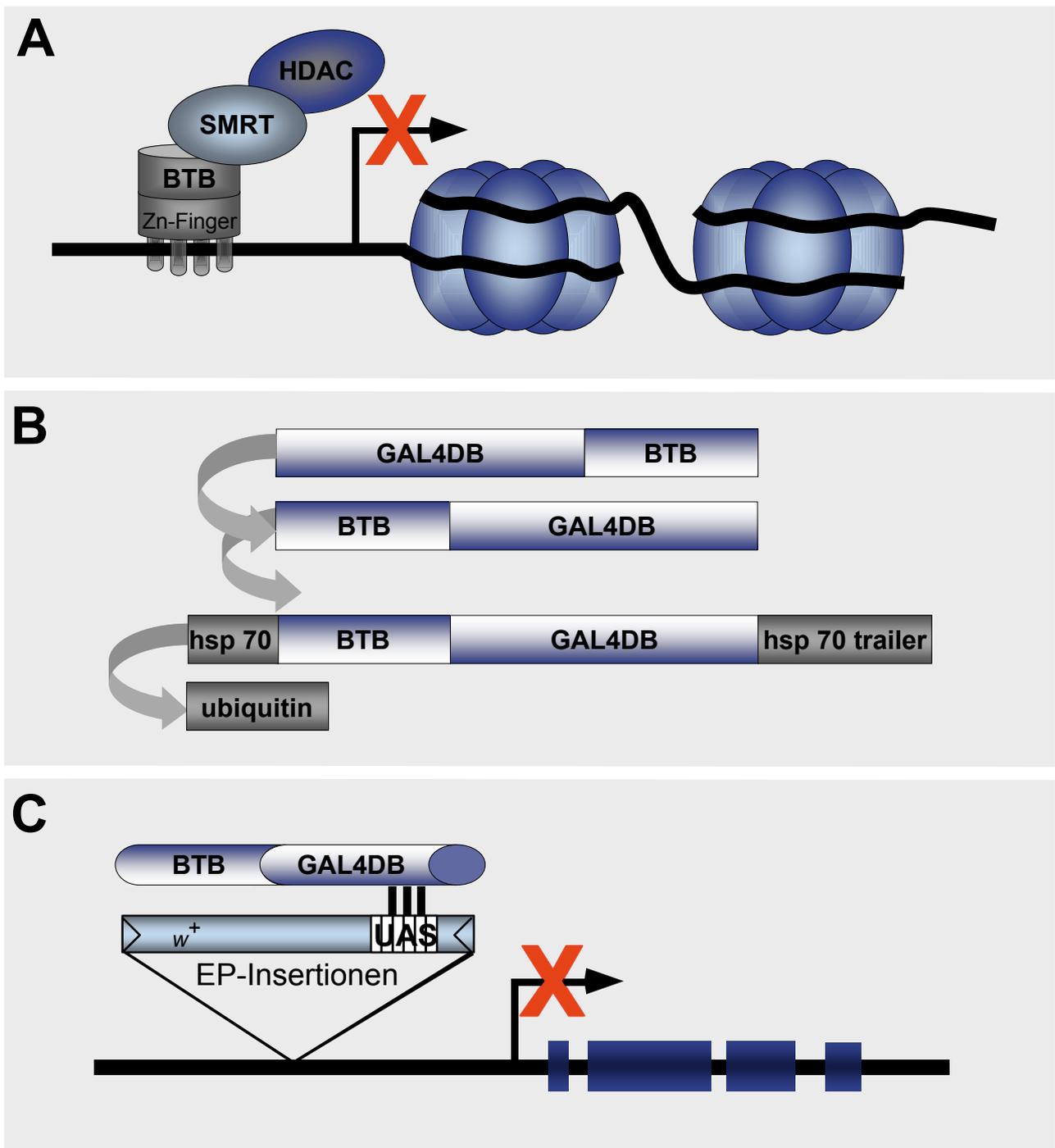


Abb.16: Modelle zur Veranschaulichung der BTB/POZ vermittelten Repression

A Zn-Finger-BTB/POZ Proteine vermitteln transkriptionelle Repression über SMRTs und HDACs

B Expression einer BTB-GAL4 Chimäre sollte UAS Ziele reprimieren

C Generierung transientser *Loss-of-function* Mutationen mit Hilfe von EP-Insertionen

Eine Expression jener in der Fliege in Anwesenheit einer EP-Insertion könnte zu einer „Blockade“ des der EP-Insertion benachbarten Gens führen und so zu einem möglichen Funktionsverlust des Gens (Abb.16C). Eine solches Procedere könnte die funktionelle Analyse eines Gens enorm beschleunigen. Der *loco* Promotor z.B. würde die Expression des GAL-BTB Konstruktes in Gliazellen induzieren. Wenn dadurch Gene benachbarter EP-Insertionen transient ausgeschaltet würden, sollte das bei einem für Gliazellen essentiellen Gen zur Letalität führen. Eine solche Kreuzung könnte dann phänotypisch analysiert werden. Die molekulare Analyse und Identifizierung des betreffenden Gens kann durch die EP-Elementinsertion schnell durchgeführt werden. Mittels verschiedener, definierter EP-Insertionen wurden die unterschiedlichen Konstrukte getestet. In keinem Fall konnte eine Letalität induziert werden. Eine EP-Insertion in das Gen *futsch* z.B. wurde benutzt, um nach Expression der BTB-GAL Konstrukte eine mögliche Reduktion der Futsch Expression analysieren zu können. Diese konnte jedoch nicht festgestellt werden. Der zuletzt erstellte *ubiquitin:BTB-GAL4* Stamm zeigte zudem eine reduzierte Vitalität. Die Etablierung stärkerer Insertionen über Transpositionen resultierte in wenigen Fällen in adulten Tieren mit stärkeren Insertionen. (Als Maß diente die stärkere Expression des *white* Gens.) Diese Tier waren jedoch nicht etablierungsfähig und starben nach wenigen Tagen.

3.4 EMS Mutagenese zur Identifizierung von Genen, die für die Entwicklung der peripheren Gliazellen notwendig sind

Um dennoch Gene zu finden, die für die gliale Funktion notwendig sind, bestand ein Teil dieser Arbeit in der Durchführung einer EMS Mutagenese. Es sollten X-chromosomale Mutationen identifizieren werden, die zu Defekten in der Anzahl der peripheren Gliazellen oder/und zu einer abnormen Migration dieser führen. In Abb.17A ist das Kreuzungsschema zur Isolierung und Etablierung X-chromosomaler Letalmutationen gezeigt. Mutagenisierte Männchen werden in der Parentalgeneration gegen *brinker/FM7* balancierte Weibchen gekreuzt (siehe auch Material und Methoden). *brinker* ist eine rezessiv letale Mutation. Dadurch überleben in der nächsten Generation nur *FM7* Männchen, so daß auf das Sammeln virgineller Weibchen für die nachfolgende Generation verzichtet werden kann. Das mutante

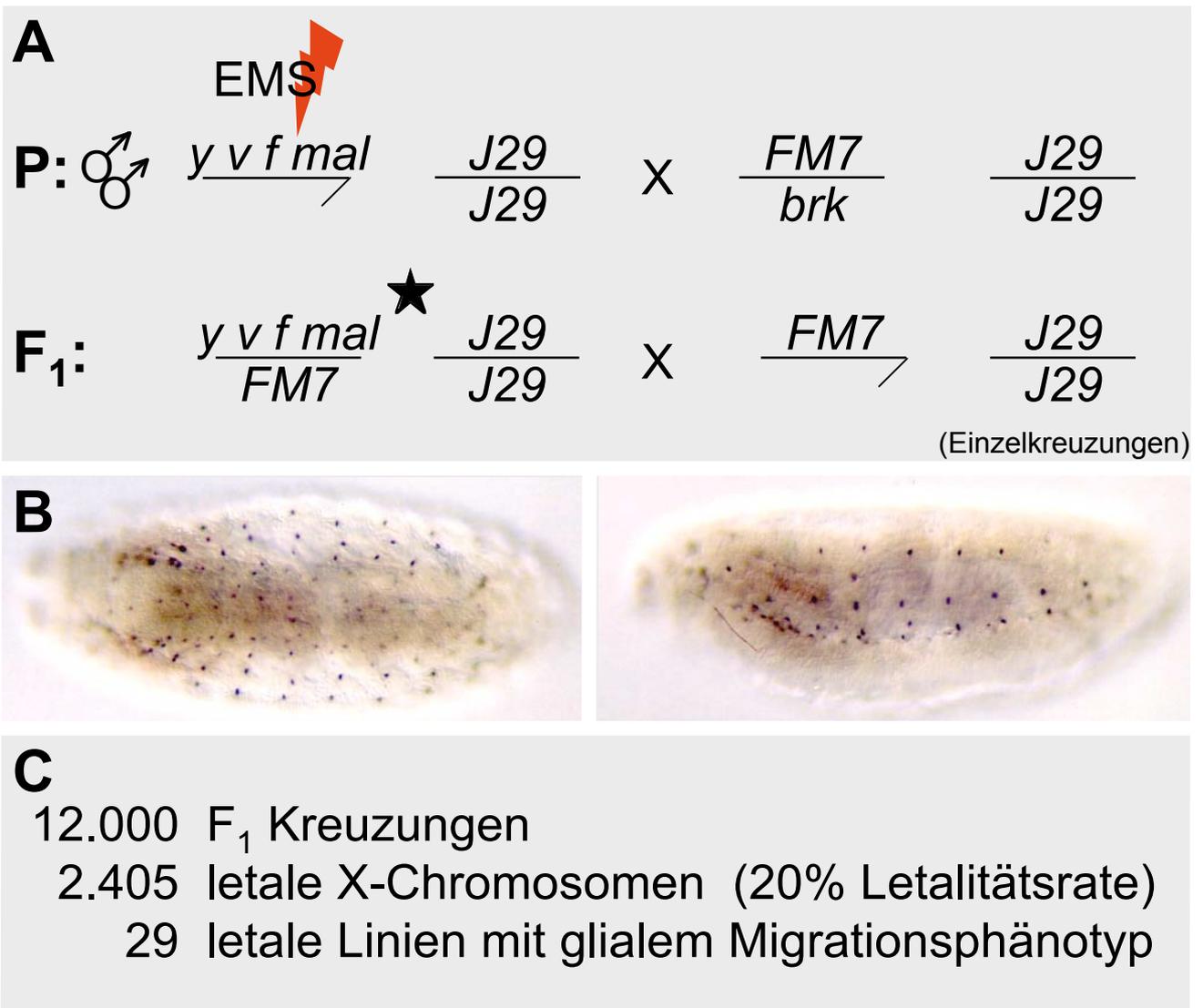


Abb.17: EMS Mutagenese zur Identifizierung X-chromosomaler Mutationen

A Kreuzungsschema **B** Wildtyp **C** Kreuzungsstatistik

Nach Durchführung der Mutagenese konnten die etablierten Stämme durch die *J29* Expression (**B**) auf Defekte bzgl. der Entwicklung der peripheren Gliazellen gesichtet werden. Aus den anfänglich 12.000 Kreuzungen wurden 29 Stämme der weiteren Analyse unterzogen (**C**).

FM7 balancierte X-Chromosom wird in der F₁ in Einzelkreuzungen als Stamm etabliert. Die Nachkommen dieser Einzelstämme werden auf Letalität gesichtet. Sind in einem Stamm nur *FM7* balancierte (*Bar* markierte) Männchen vorhanden, sind die induzierten Mutationen letal, da das mutierte X-Chromosom in Hemizygotie nicht lebensfähig ist. Der Zeitpunkt der Letalität war hierbei kein Selektionskriterium.

3.4.1 Durchführung des Screens

Aus 12.000 F₁ Einzelkreuzungen wurden 2405 letale Linien etabliert. Dies entspricht einer Letalitätsrate von 20 % (Abb.17C). In „den Hintergrund“ aller Chromosomen wurde zuvor die *J29* Enhancer trap Insertion gekreuzt, um die peripheren Gliazellen markieren zu können (Abb.17B). Mit Hilfe der Blockablagen (siehe Material und Methoden) wurden die 2405 letalen Stämme immunhistochemisch gefärbt, und das Muster der peripheren Gliazellen wurde untersucht. Abb.17B zeigt den wildtypischen Phänotyp in ventraler (links) und lateraler Ansicht (rechts). Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß anfänglich 60 Stämme identifiziert wurden, in denen die Entwicklung der peripheren Gliazellen gestört ist. Von diesen wurden 29, die spezifischere Defekte aufwiesen, zur weiteren Analyse behalten (Abb.17C).

3.4.2 Identifizierung der Phänotypen

Um in den Ablagen die hemizygoten Embryonen eindeutig identifizieren zu können, wurden „blaue Balancer“ benutzt. So wurden die Mutationen über ein *FM7c^{bb} P[ry⁺, ftz-lacZ]* markiertes Chromosom balanciert. Die Ablagen von etablierten Linien wurden so durchgeführt, daß ein Großteil der Embryonen sich in der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung (ca. Stadium 11/12) befand. Frühe Entwicklungsprozesse sind hier bereits abgeschlossen. Die Eiablagen erfolgten konstant auf 25 °C. Die gefärbten Embryonen eines letalen Stammes wurden aus der Färbeschale, in der sich je 30 gefärbte Linien befanden, herausgenommen und auf Objektträger transferiert. Mit Hilfe eines Stereomikroskops wurden Stadium 16 Embryonen selektioniert und es wurden solche Mutanten gesucht, die in Position oder Anzahl der Nuclei *J29* positiver, peripherer Gliazellen im Vergleich zum Wildtyp divergierten.

3.4.2.1 Erste Kriterien der Sichtung

Von den etablierten Stämmen wurde nach mehrmaligem Sichten der Mutationen ein Großteil verworfen. Verworfen wurden solche Stämme, die in die Kategorie „morphogenetische Defekte“ eingeteilt wurden. Morphogenetische Defekte sind solche, die neben auffälligen Veränderungen in der Entwicklung oder Migration der peripheren Gliazellen morphogenetische, d.h. die Gesamtgestalt des Embryos betreffende Defekte aufweisen. Bei dieser Kategorie von Phänotypen ist meistens nicht zu unterscheiden, ob die beobachteten Entwicklungsdefekte der Gliazellen nicht lediglich sekundäre Folgeerscheinungen darstellen. Als solche Defekte wurden eingeordnet: sehr frühe Defekte morphogenetischer Bewegungen, Defekte entlang der dorsoventralen Achse, Defekte in der segmentalen Organisation der Embryonen und ektodermale Defekte.

Dennoch sind einige Stämme mit solchen Defekten in die weitere Analyse aufgenommen worden. Dies geschah aus mehreren Gründen. Gene, die essentiell für die Entwicklung der peripheren Gliazellen sind, können auch essentielle Gene früher Entwicklungsprozesse sein. Ein Beispiel ist das Gen *Notch*. In *Notch* Mutanten ist die Differenzierung des Ektoderms gestört. Im Screen wurden insgesamt vier unabhängige Mutationen im *Notch* Locus identifiziert. Eine dieser Mutationen ist ein stark hypomorphes *Notch* Allel. Es treten keine neurogenen Defekte auf, dennoch zeigen die mutanten Embryonen Migrationsdefekte peripherer Gliazellen. In den Mutanten *1-5B2*, *2-11X* und *7-12F4* zeigen Embryonen derselben Ablage neben morphogenetischen Defekten auch spezifische Entwicklungsdefekte der peripheren Gliazellen (vgl. Abb.26C und D).

3.5 Entwicklungs- und Migrationsdefekte peripherer Gliazellen

Erwartete Differenzierungsdefekte, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden können, beschränken sich auf die Detektion von entweder mehr oder weniger *J29* positiven Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Für Klassen von Migrationsdefekten können verschiedene Möglichkeiten postuliert werden: Alle *J29* markierten Gliazellen migrieren entweder zu weit in das PNS oder alle verbleiben in der ZNS/PNS Übergangszone. Ein Teil der Gliazellen migriert zu weit oder gar nicht

oder die Gliazellen der Segmente eines Embryos zeigen unterschiedliches Migrationsverhalten.

Wie in der Tabelle zusammengefaßt, wurden Vertreter solcher Klassen gefunden:

Tabelle 2

Zusammenfassung der selektierten Mutationen

		Anzahl mutanter Stämme:	
Differenzierung	mehr periphere Gliazellen		8
	weniger periphere Gliazellen		1
Migration	erhöhte Migration		4
	reduzierte Migration		10
	unregelmäßige Migration		14

Die Mutationen, in denen abnorme Anzahlen von Gliazellen auftraten, wurden zudem in die Gruppen mit abnormer Migration einsortiert, da die ektopischen Gliazellen sich bzgl. ihrer Verteilung entlang der axonalen Trakte des PNS unterschiedlich verhielten. Die meisten Allele zeigen einen unregelmäßigen Migrationstyp. In diese Gruppe fallen auch sehr gering penetrante Phänotypen. Generell gibt diese Klassifizierung nur einen Überblick. Der analysierte Prozeß an sich erlaubt keine Einteilung in exakt voneinander abgegrenzte Kategorien.

Es wurde nur eine Mutation aufgedeckt, die reproduzierbar weniger Gliazellen aufwies. Acht Stämme hingegen zeigten mehr *J29* positive Gliazellen, von denen eins das schon erwähnte *Notch* Allel ist.

3.5.1 Mutationen, die zu unregelmäßiger Migration peripherer Gliazellen führen

Mutationen, die in diese Kategorie eingeordnet wurden, sind in den Abb.18 und 19 dargestellt. Diese phänotypische Klasse ist sehr heterogen, gleichzeitig umfaßt sie die meisten Mutanten. Viele der gefundenen Mutationen lassen sich zunächst durch die gewählten Screenbedingungen nicht näher beschreiben und

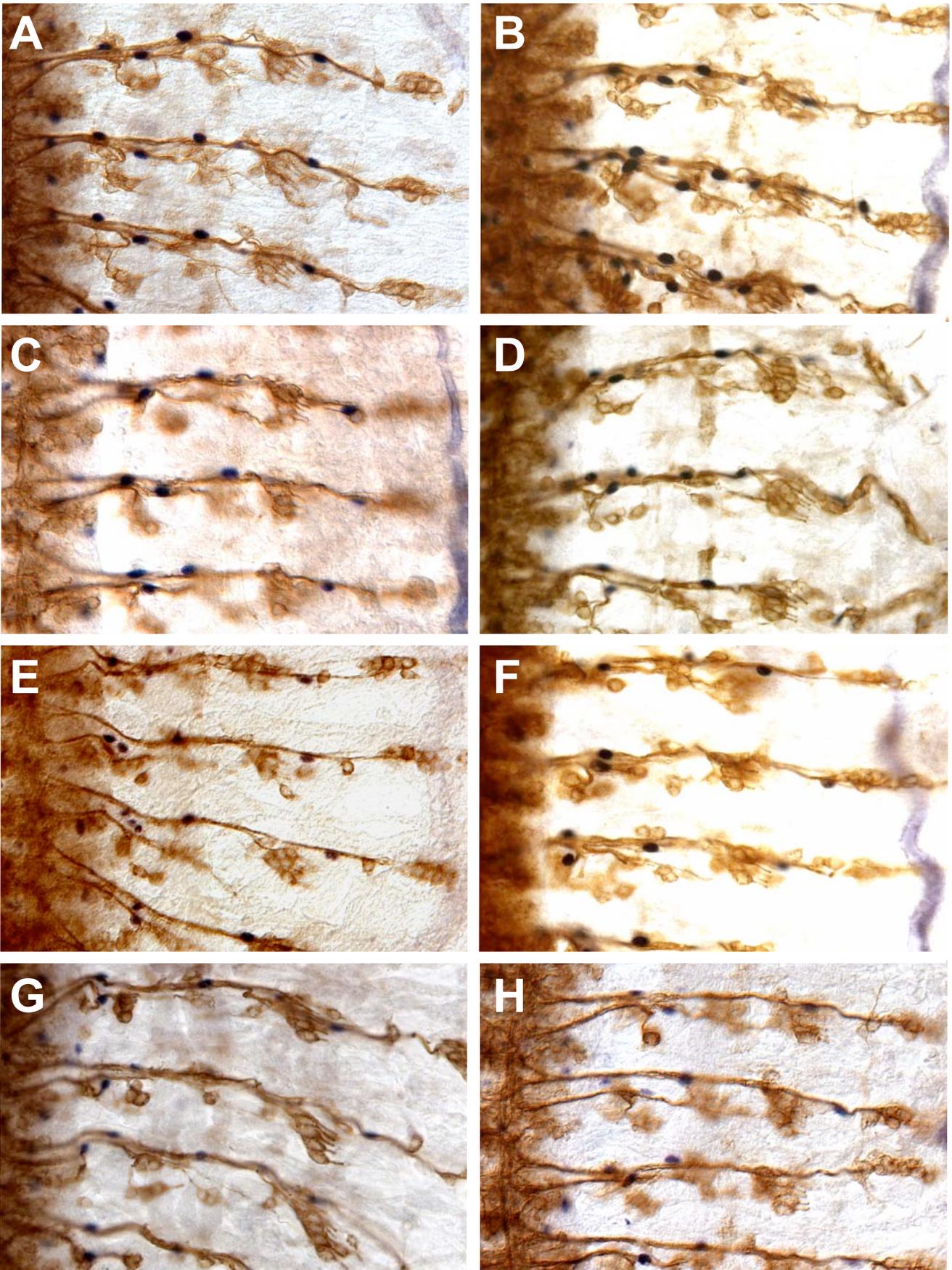


Abb.18: Mutationen, die zu einer unregelmäßigen Migration peripherer Gliazellen führen - I

A Wildtyp **B** *NB-8X* **C** *XII-14D1* **D** *7-12F4* **E** *VII-19H5* **F** *XII-13D1* **G** *6-16E3* **H** *XII-8E1*

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion *J29* dargestellt.

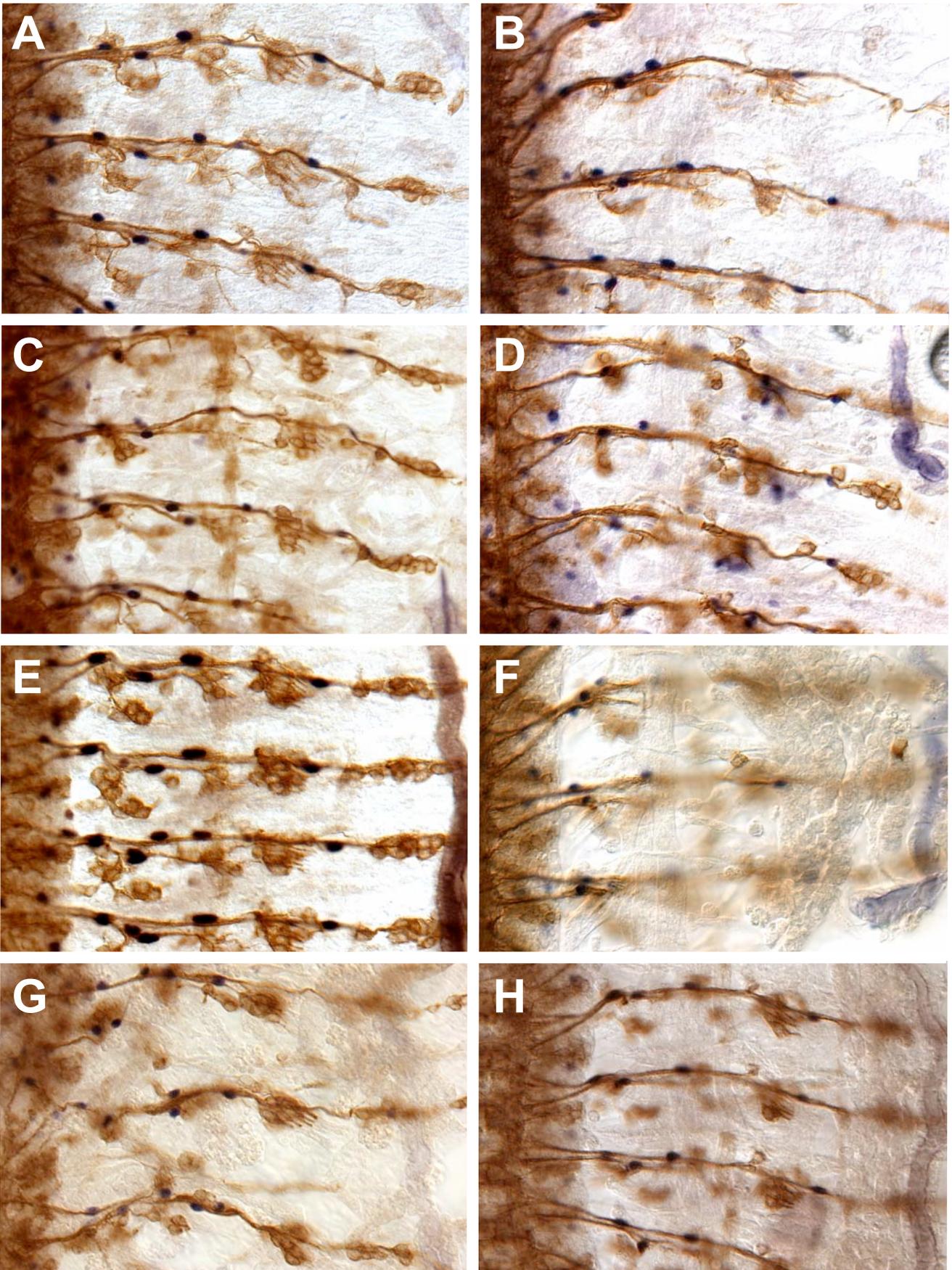


Abb.19: Mutationen, die zu einer unregelmäßigen Migration peripherer Gliazellen führen - II

A Wildtyp **B** *12-7E1* **C** *VII-17G8* **D** *XIII-21E3* **E** *II-25E4* **F** *I-19H8* **G** *wex^{4-20E1}* **H** *II-8H3*

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion *J29* dargestellt.

wurden daher in diese eher oberflächliche Kategorie eingeordnet. In diese Klasse von Phänotypen fallen auch viele der Mutanten, die den Phänotyp nicht sehr penetrant ausprägen. Letzteres ist natürlich auch charakteristisch für eine „unregelmäßige Migration“, somit für die gesamte Klasse der hier eingeordneten Phänotypen.

3.5.1.1 Migrationsdefekte

Die Mutationen können in die folgenden Klassen eingeteilt werden:

1. Phänotypen, in denen die peripheren Gliazellen in einigen Segmenten wildtypisch migrieren, in anderen zu weit in die Peripherie migrieren.
12-7E1, *wex*^{6-8F3}, *wex*^{4-20E1}, XII-13D1, XII-14D1, 7-12F4, XII-8E1
2. Phänotypen, in denen die peripheren Gliazellen in einigen Segmenten wildtypisch migrieren, in anderen zu nah an der ZNS/PNS Grenze verbleiben.
XIII-21E3, I-19H8, II-8H3
3. Phänotypen, in denen die peripheren Gliazellen innerhalb einiger Segmente zu weit migrieren, in anderen zu wenig.
VII-17G8, II-25E4, *N*^{B-8X}, *N*^{A-3E3}, VII-19H5, 6-16E3

Ein weiteres Kriterium der Migrationsdefekte ist die Assoziation der *J29* positiven Nuclei an die Axone des Segmental- und Intersegmentalnervs. In *VII-19H5* mutanten Embryonen befinden sich viele *J29* positive Nuclei zwischen dem Segmental- und Intersegmentalnerv (Abb.18E) an Stellen, an denen im Wildtyp keine der peripheren Gliazellnuclei beobachtet wurden. Ob es sich bei der in einigen Segmenten überzähligen Anzahl evtl. um fehlmigrierte, fehlpositionierte Subperineuralgliazellen oder zusätzliche periphere Gliazellen handelt, konnte nicht determiniert werden.

Die Allele der Komplementationsgruppen *Notch* und *westfalenexpress* (*wex*) sowie die Mutationen *7-12F4*, *II-25E4* und *VII-19H5* weisen zudem mehr *J29* positive Zellen auf.

3.5.1.2 Neuronale PNS Defekte

Das Fehlen von Gliazellen in der sog. *glial cells missing (gcm)* Mutante führt im embryonalen Nervensystem zu Defekten in ZNS und PNS. Die Kommissuren des ZNS sind defaszikuliert und teils fusioniert, die Konnektive sind oftmals verdünnt und im PNS verlaufen Segmental- und Intersegmentalnerv parallel und defaszikulieren teilweise (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996). Zudem existieren, wie in Ablationsstudien gezeigt wurde, enge trophische Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen im PNS (Sepp and Auld, 2003a).

Daher sind neuronale Marker mit in die Analyse der Mutanten einbezogen worden. Neuronale Defekte können im Zusammenhang mit der Fehlmigration der peripheren Gliazellen Aufschluß über die einzelnen Mutationen geben. Die Mutationen *XII-8E1*, *VII-19H5*, *6-16E3* und *XIII-21E3* weisen im PNS parallel verlaufende Segmental- und Intersegmentalnerven auf. Generell ist die Gesamtmorphologie der Großteils der Gruppe der unregelmäßig migrierten Mutanten relativ geordnet. Ausnahmen sind: *wex^{4-20E1}*, *wex^{6-8F3}*, *N^{A-3E3}*, *VII-17G8* und *7-12F4*. *VII-17G8* mutante Embryonen zeigen im PNS - neben einer ungeordneten Struktur der Chordotonalorgane und axonalen Fehlprojektionen - auch periphere Gliazellen an abnormen Positionen (z.B. am Rand der Chordotonalorgane; Daten nicht gezeigt).

3.5.2 Mutationen, die zu reduzierter Migration peripherer Gliazellen führen

Mutationen dieser Klasse sind in den Abb.20 und 21 dargestellt. Die Klasse dieser Phänotypen ist relativ uniform. Bei einem Teil der hier eingeordneten Mutanten migrieren alle der *J29* positiven Zellen weniger oder teils gar nicht, d.h. die Nuclei befinden sich in der Nähe des ZNS. Dies trifft v.a. für die beiden im Screen gefundenen *crooked neck (crn)* Allele, *crn^{IX-15H6}* und *crn^{III-26H8}* (Abb.20D und Abb.21D) zu. Eine andere Mutante, bei der es sich vermutlich um ein weiteres *crn* Allel handelt, ist das Allel *V-8H7* (Abb.20B). In diese Gruppe fallen ebenso die Mutanten *2-11X* und *1-5 B2*.

In *I-23H6* und *VIII-24E3* mutanten Embryonen (Pfeile Abb.20C und 21F)

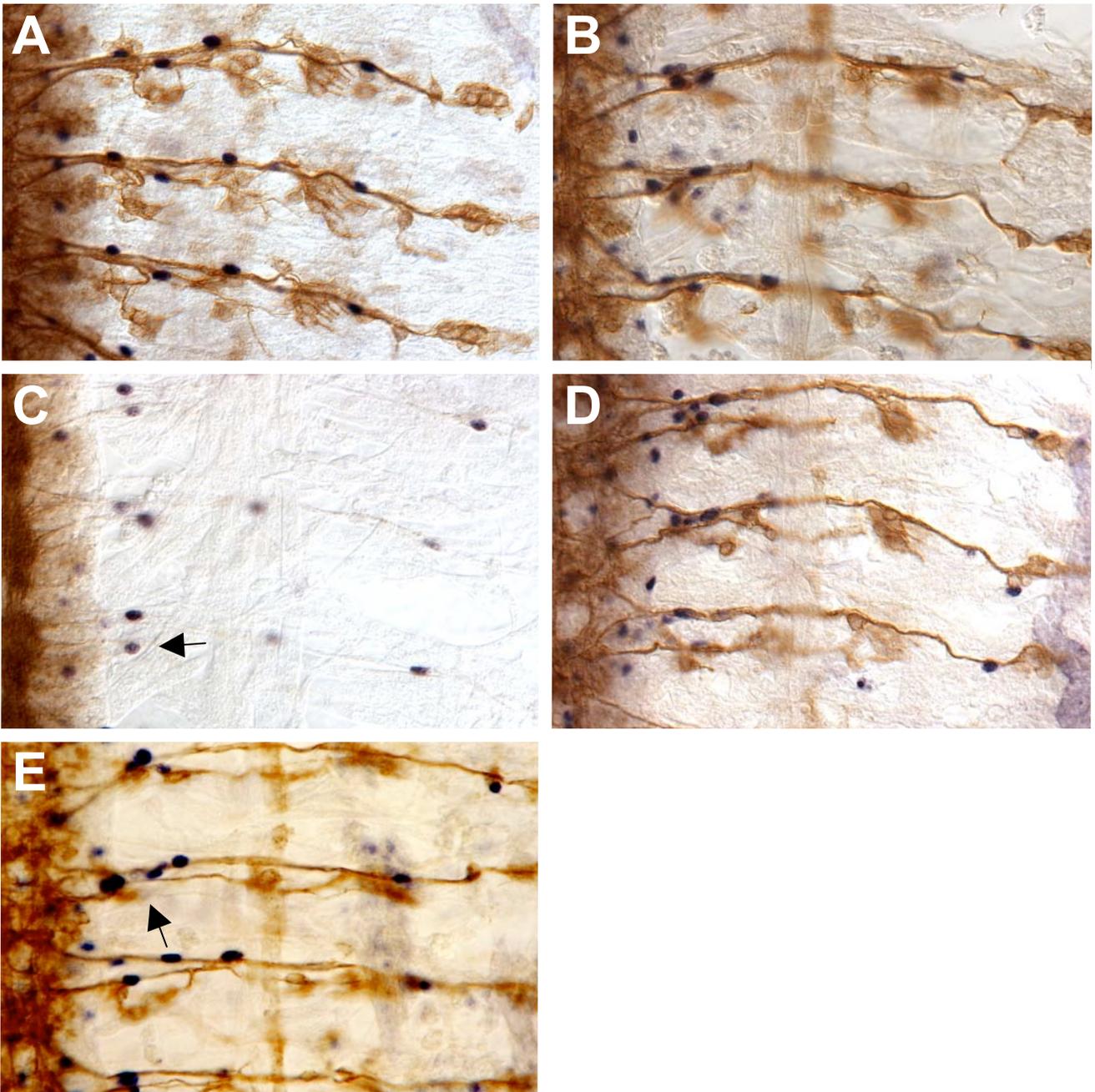


Abb.20: Mutationen, die zu reduzierter Migration peripherer Gliazellen führen - I

A Wildtyp **B** V-8H7 **C** I-23H6 **D** *crn^{IX-15H6}* **E** XIII-15C8

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion J29 dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

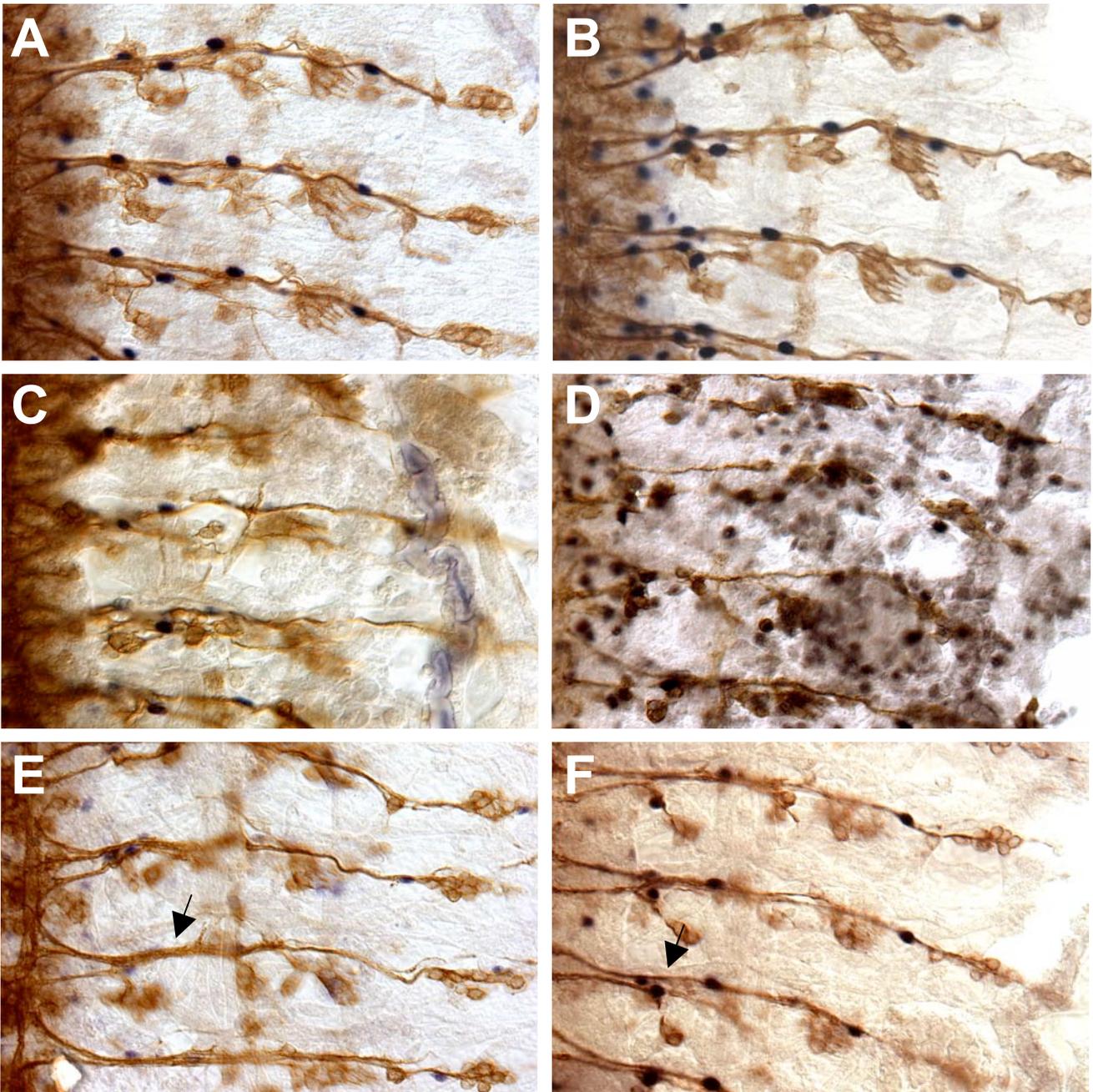


Abb.21: Mutationen, die zu reduzierter Migration peripherer Gliazellen führen - II

A Wildtyp **B** *I-13H2* **C** *I-5B2* **D** *cm^{III-26H8}* **E** *2-11X* **F** *VIII-24E3*

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion *J29* dargestellt. Der Pfeil in **E** deutet auf defaszikulierte Bereiche der Axontrakte. Der Pfeil in **F** markiert ein Beispiel reduzierter Migration der ventralen peripheren Gliazelle.

erscheint es oft, als ob die dem ZNS nahesten peripheren Gliazellen auf gleicher Höhe mit der ventrolateralen Gliazelle zu liegen käme. Ursächlich hierfür kann sein, daß die ventrolaterale periphere Gliazelle nicht die wildtypische Distanz zurücklegt. *I-13H2* mutante Embryonen besitzen zwei *J29* positive Glia-Nuclei am Segmentalnerv, die distanziert voneinander unregelmäßig weit aber oft nicht in voller Weite migrieren. *XIII-15C8* ist ein Vertreter dieser Gruppe, in dem es trotz oftmals übermäßiger Anzahl von Gliazellen nicht zu einer ausreichenden Migration in die Peripherie kommt.

Neuronale PNS Defekte können bis auf die Mutante *I-13H2* in allen dieser Gruppe zugehörigen Vertretern beobachtet werden. Oft sind dies defaszikulierte Bereiche (Pfeil Abb.21E) und weniger Neurone (Pfeil Abb.20E).

3.5.3 Mutationen, die zu erhöhter Migration peripherer Gliazellen führen

Mutationen dieser phänotypischen Klasse sind in Abb.22 dargestellt. Im Screen wurden keine Phänotypen gefunden, in denen die Gliazellen deutlich zu weit migrieren. Nur in der Mutante *14-2D2* ist die periphere Gliazelle, die im Wildtyp unterhalb des lateralen Clusters lokalisiert ist, in dorsaleren Positionen zu finden (vgl. Pfeile Abb.22A und D). In den anderen Mutanten, die zu einer übermäßigen Migration führen, ist diese Zelle meistens korrekt lokalisiert. Hier migriert - im Vergleich zum Wildtyp - die dem ZNS nahesten Zelle weiter nach dorsal ohne jedoch auf die dorsalste *J29* positive Zelle aufzurücken. Es bleibt stets eine Distanz zwischen diesen (vgl. Pfeilkopf Abb.22A und B mit Pfeil Abb.22A und B).

Mutanten dieser Klasse weisen sehr moderate neuronale Defekte auf. In den Mutanten *2-23D1* und *1-7B2* kommt es in einigen Segmenten zu parallel verlaufenden Intersegmental- und Segmentalnerven (Pfeil Abb.22C). *J29* positive Nuclei *1-7B2* mutanter Embryonen sind zudem unterschiedlich groß, und es gibt selten axonale Fehlprojektionen der lateralen Cluster. Für diese Gruppe wurden – mit Ausnahme der Mutante *2-23D1* - keine vom Wildtyp abweichenden ZNS Defekte festgestellt (determiniert mittels des mAb BP102).

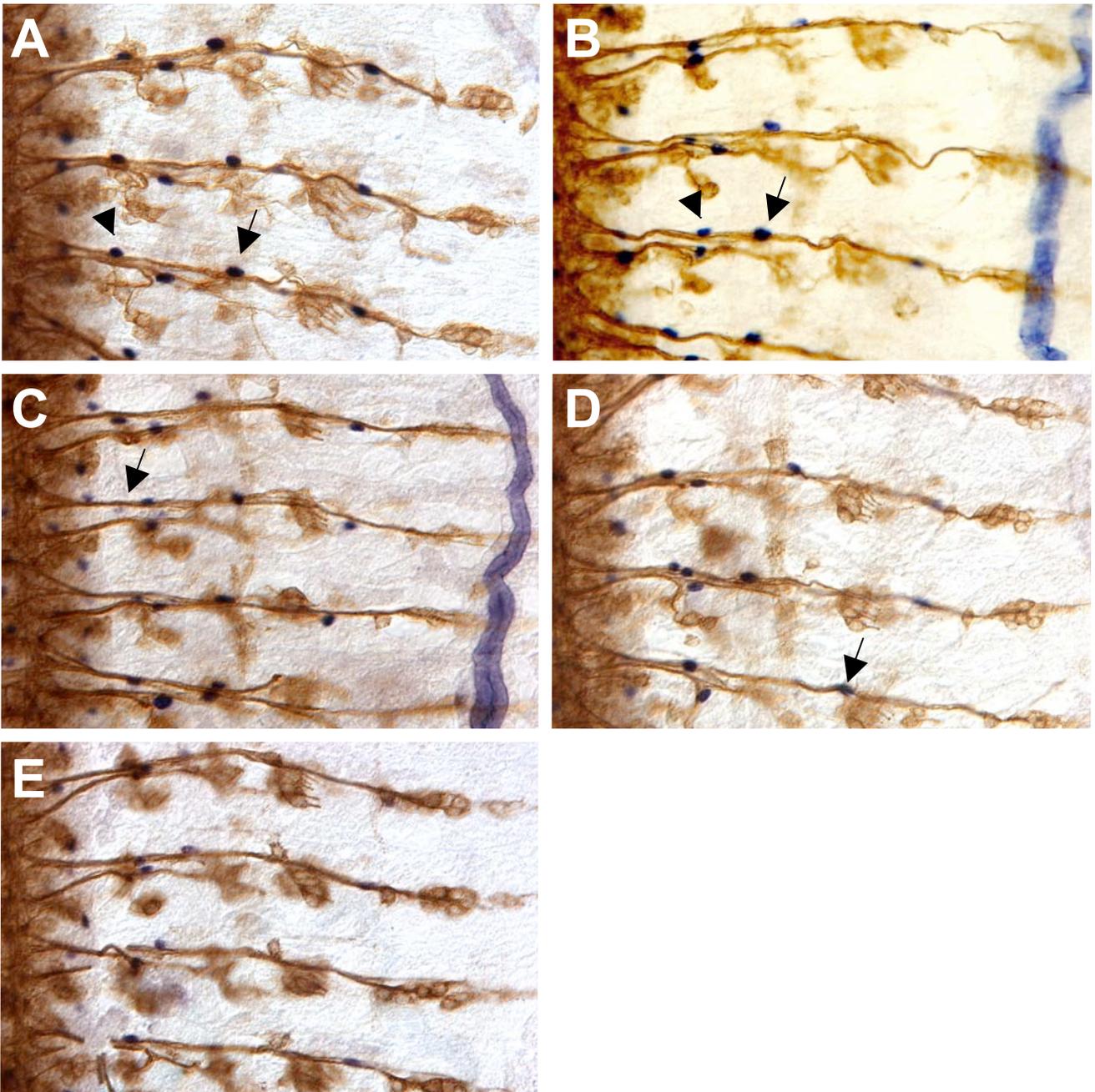


Abb.22: Mutationen, die zu erhöhter Migration peripherer Gliazellen führen

A Wildtyp **B** 2-23D1 **C** I-7B2 **D** 14-2D2 **E** F-14B7

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion J29 dargestellt. Details siehe Text.

3.5.4 Defekte in der Organisation der ZNS Axone

Fehlmigration oder –differenzierung der Mittellinienglia, führt, wie in der Einleitung beschrieben, zu einem charakteristischen ZNS Phänotyp von fusionierten Kommissuren. Zudem wurde durch Mutagenesen auf Veränderungen des axonalen Musters in ZNS und PNS festgestellt, daß etwa 80% von Mutationen, die das PNS betreffen, auch zu ZNS Defekten führen (Hummel, 1998). Durch die Verwendung des mAb BP102 können die ZNS Axone und damit die „Strickleiter“ des ZNS sichtbar gemacht werden. Die Grobkategorisierung der 29 einzelnen Mutationen fand in Anlehnung an die von T. Hummel aufgestellten Klassen statt (Hummel, 1998). 16 der 29 hier untersuchten Mutanten zeigten einen ZNS Phänotyp.

3.5.4.1 Reduktion und Desorganisation der Kommissuren und Konnektive

Die in diese Klasse fallenden Mutationen sind in Abb.23 dargestellt. Die Mutationen der beiden *wex* Allele (Abb.23C und D) besitzen reduzierte Konnektive und Kommissuren: in *wex*^{4-20E1} mutanten Embryonen ist eine der Kommissuren pro Segment vorhanden, während in *wex*^{6-8F3} mutanten Embryonen weder Kommissuren noch Konnektive zu sehen sind. In *1-5B2* mutanten Embryonen weist das ZNS neben reduzierten Konnektiven auch Brüche auf; Bereiche, in denen weder Kommissuren noch Konnektive vorhanden sind (Abb.23B). *crn*^{III-26H8} mutante Embryonen besitzen reduzierte Kommissuren und reduzierte Konnektive. Die ZNS Phänotypen der Mutanten *XII-8E1* und *VII-17G8* (Abb.23E und F) ähneln sich: die Kommissuren und Konnektive sind v.a. desorganisiert. Man beobachtet diagonal verlaufende kommissurale Fasern (Pfeil Abb.23E) sowie eine Reduktion der Konnektive (Pfeil Abb.23F).

3.5.4.2 Reduktion der Konnektive

Mutanten, die in die Gruppe der ZNS Phänotypen mit reduzierten Konnektiven fallen, wurden in Abb.24 dargestellt. Bei Vertretern dieser Gruppe sind Übergänge zu den Phänotypen mit fusionierten Kommissuren jedoch fließend wie z.B. in der Mutante *crn*^{IX-15H6} (Pfeil Abb.24C vgl. Abb.25). Konnektive der Mutanten *crn*^{IX-15H6}, *XIII-15C8* und *V-8H7* sind in mehreren Segmenten reduziert. Das ZNS der

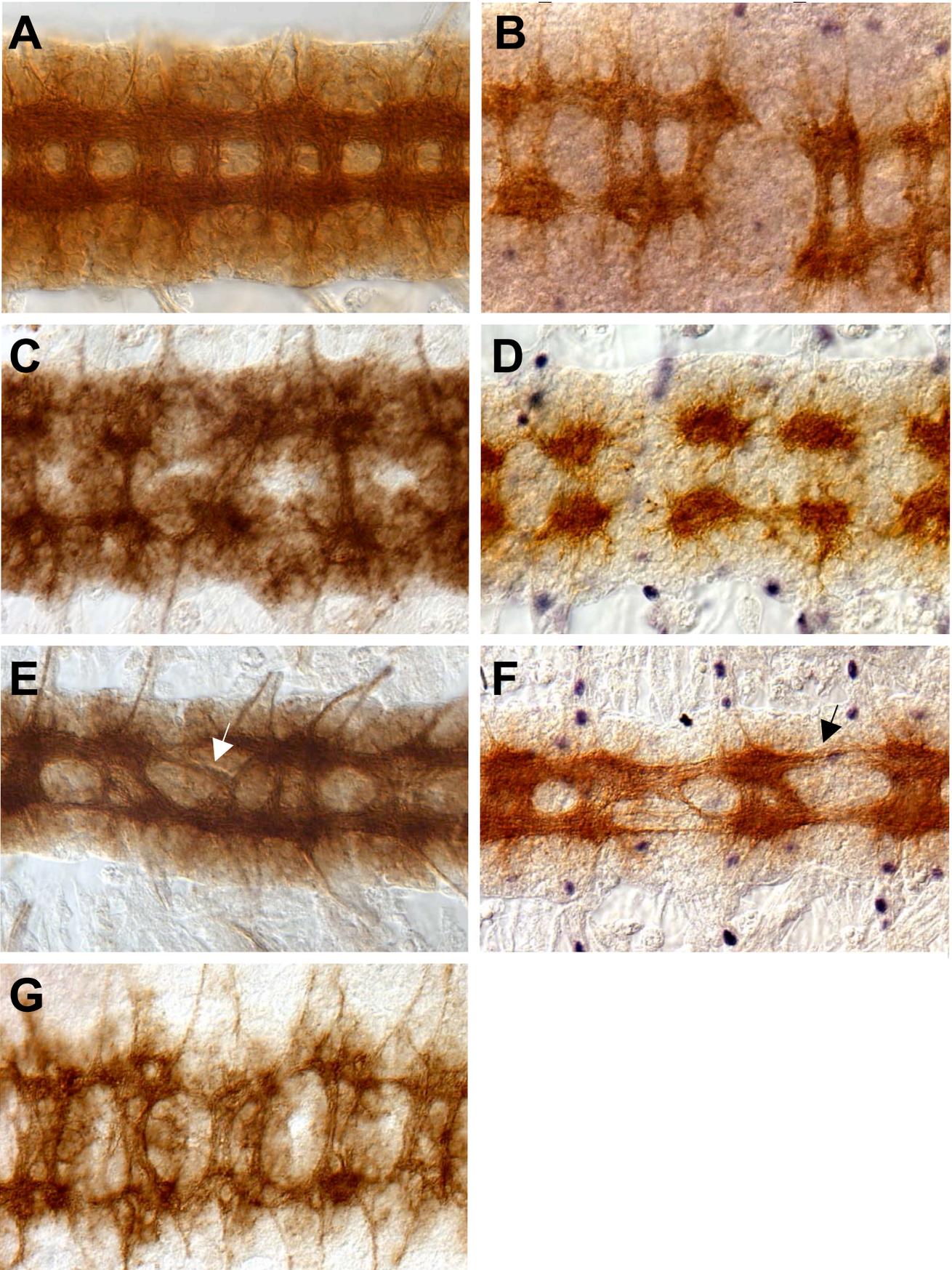


Abb.23: Defekte in der Organisation der ZNS Axone: Reduktion und Desorganisation der Kommissuren und Konnektive

A Wildtyp **B** *l-5B2* **C** *wex*^{4-20E1} **D** *wex*^{6-8F3} **E** *XII-8E1* **F** *VII-17G8* **G** *crn*^{III-26H8}

ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist links. Die Anordnung der ZNS Axone wurde mit dem mAb BP102 dargestellt. Die Pfeile deuten auf desorganisierte Kommissuren und Konnektive (**E**) bzw. reduzierte Konnektive (**F**).

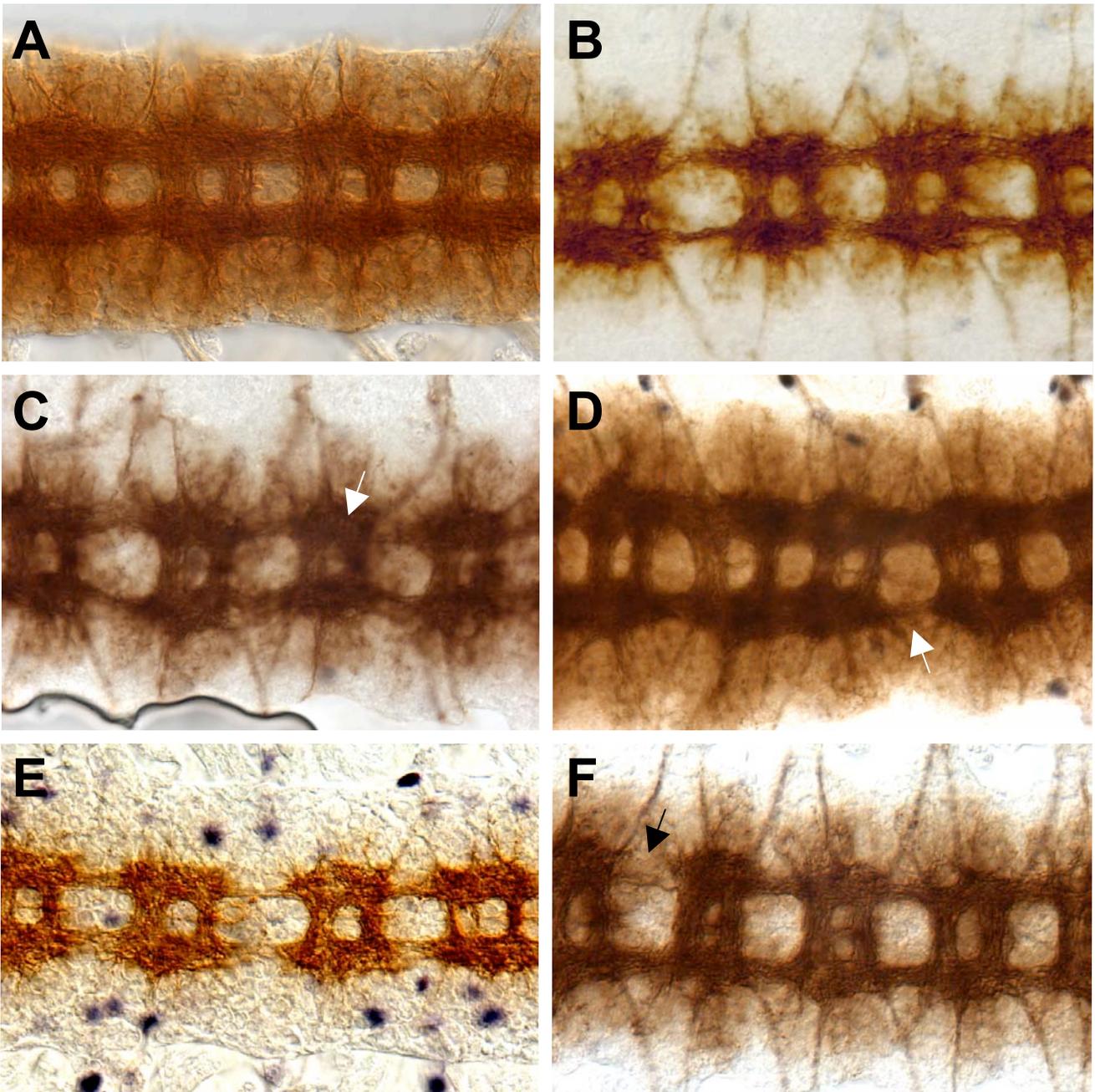


Abb.24: Defekte in der Organisation der ZNS Axone: Reduktion der Konnektive

A Wildtyp **B** XIII-15C8 **C** *cm^{IX-15H6}* **D** *N^{B-8X}* **E** V-8H7 **F** XIII-21E3

ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist links. Die Anordnung der ZNS Axone wurde mit dem mAb BP102 dargestellt. Die Pfeile in **D** und **F** markieren Brüche in den Konnektiven, der Pfeil in **C** deutet auf fusionierte Kommissuren.

Mutanten N^{B-8X} und *XIII-21E3* weist nur in einigen Bereichen reduzierte Konnektive auf (Pfeile Abb.24D und F). Vollständig unterbrochen sind diese Bereiche jedoch in keiner der Mutanten dieser Gruppe.

3.5.4.3 Fusionierte und defaszikulierte Kommissuren

Mutationen dieser phänotypischen Klasse sind in Abb.25 dargestellt. Eine Fusion der Kommissuren mit gleichzeitiger Reduktion der Konnektive ist in der Mutante *I-23H6* zu beobachten (Abb.25B). Die Kommissuren hier sind stark fusioniert. Die anderen vier Mutanten besitzen ebenfalls fusionierte Kommissuren, doch können hier noch anteriore und posteriore Kommissur voneinander unterschieden werden. Innerhalb einiger Segmente kommt es zu einer Auflockerung der axonalen Trakte, die Kommissuren wirken nicht reduziert, sondern vielmehr in sich defaszikuliert (Pfeil Abb.25E). Bei der Mutante *2-23D1* kommt es neben der Defaszikulation der kommissuralen Trakte auch zu einer Defaszikulation der Konnektive, die v.a. in früheren Stadien zu gut zu sehen ist und auch in älteren Stadien persistiert (Pfeil Abb.25F).

3.5.5 Differenzierungs- und Faszikulationsdefekte

Wie erwähnt, ist nicht viel über die Gene bekannt, die die Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen steuern. Frühe Prozesse der Migration, z.B. die Selektion der zu migrierenden Subpopulationen, sind oft gleichbedeutend mit der frühen Differenzierung dieser Zellen. Zudem kann die Analyse von Mutanten mit ektopischer oder im Gegenteil geringerer Anzahl peripherer Gliazellen Aufschlüsse über das Migrationsverhalten der peripheren Gliazellen an sich geben. Migrieren ektopische Gliazellen? Sortieren sich diese dann mit definiertem Abstand zur nächsten Gliazelle entlang des Nervs ein oder entstehen Anhäufungen von Zellen? Existieren Lücken dort, wo Gliazellen fehlen oder positionieren sich die vorhandenen Gliazellen anders?

3.5.5.1 Mutationen mit erhöhter Anzahl *J29* positiver Nuclei

Mutationen mit erhöhter Anzahl *J29* positiver Glia nuclei sind in Abb.26

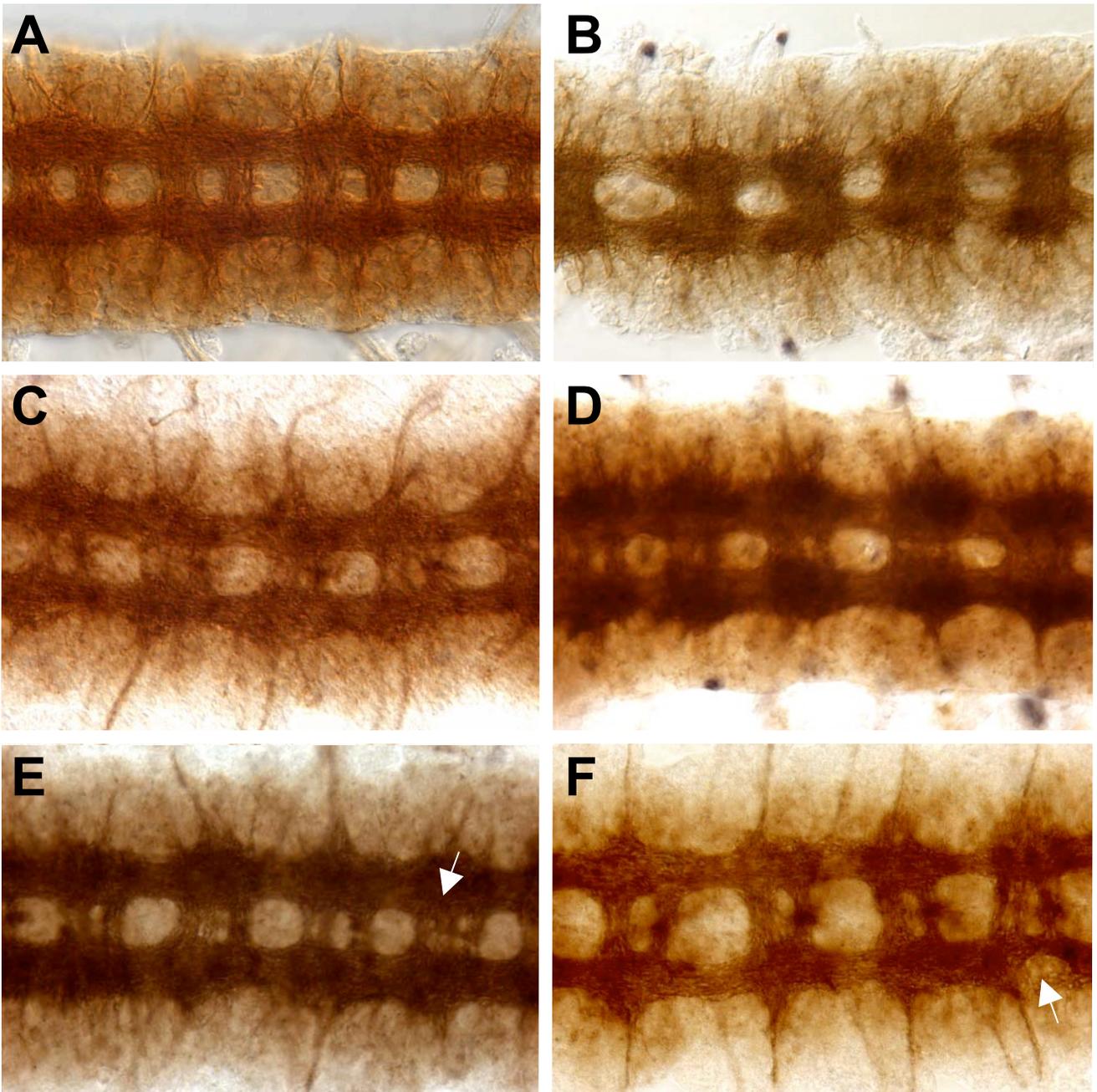


Abb.25: Defekte in der Organisation der ZNS Axone: Fusionierte und defaszikulierte Kommissuren

A Wildtyp B *l-23H6* C *2-11X* D *XII-13D1* E *6-16E3* F *2-23D1*

ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist links. Die Anordnung der ZNS Axone wurde mit dem mAb BP102 dargestellt. Der Pfeil in **E** markiert eine defaszikulierte Kommissur, der Pfeil in **F** deutet auf eine Defaszikulation der Konnektive.

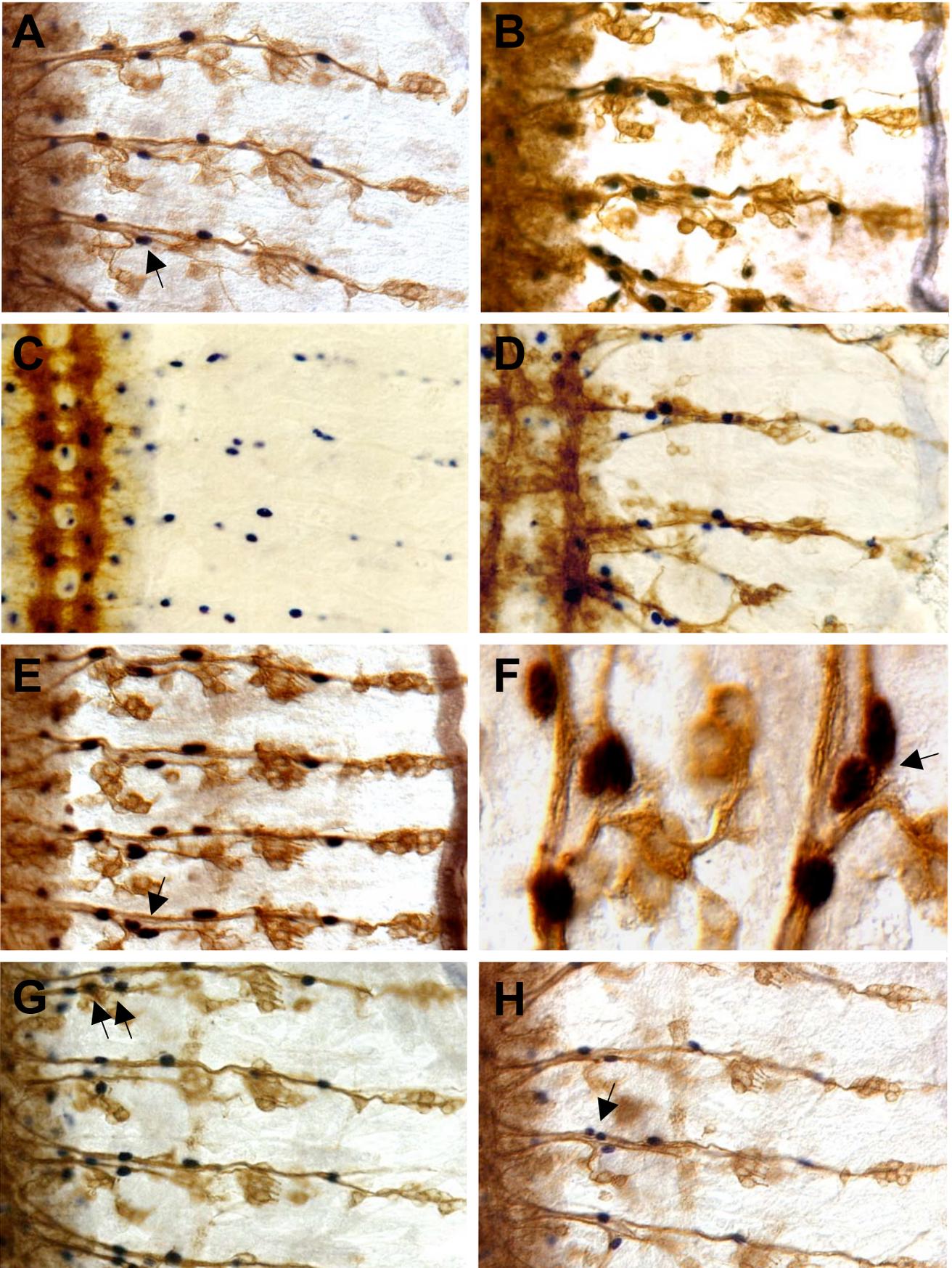


Abb.26: Mutationen mit erhöhter Anzahl J29 positiver Nuclei

A Wildtyp **B** N^{B-8X} **C** 7-12F4 **D** 7-12F4 **E** II-25E4 **F** II-25E4 Ausschnitt **G** I-13H2 **H** 14-2D2

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet (F: ZNS unten, anterior links). Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion J29 dargestellt. (Nicht dargestellte Mutanten mit erhöhter Gliazellanzahl: VII-19H5, wex^{4-20E1} , wex^{4-20E1})

zusammengestellt, PNS Neurone wurden mit dem mAb anti-Futsch markiert. Die Mutation *7-12F4* und das Notch Allel N^{B-8X} weisen bis zu fünf ektopische *J29* positive Nuclei auf, die sich entlang der axonalen Trakte des Segmental- und Intersegmentalnervs verteilen. Interessant ist die Verdopplung, bzw. das Vorhandensein einer weiteren peripheren Gliazelle am Segmentalnerv der Mutationen *II-25E4* und *I-13H2* (Abb.26E bis G). In *II-25E4* mutanten Embryonen befinden sich diese beiden Nuclei direkt nebeneinander in der Position, in der im Wildtyp die ventrolaterale periphere Gliazelle ebenfalls lokalisiert ist: an der Abzweigung der beiden ventralen Gruppen (vgl. Pfeile Abb.26A und 26E,F). Ein anderes Bild bietet die Mutation *I-13H2*. Auch hier existiert eine ektopische periphere Gliazelle am Segmentalnerv. Diese ist aber in jedem Segment in einem relativ regelmäßigen Abstand zur anderen lokalisiert (Pfeile Abb.26G). Im PNS der Mutanten *14-2D2* (Pfeil Abb.26H) und *VII-19H5* (nicht gezeigt) befindet sich in einigen Segmenten eine zusätzliche, *J29* positive Gliazelle, die mit weiter nach dorsal zu migrieren scheint oder später in der Entwicklung dort entsteht.

3.5.5.2 Mutationen mit Faszikulationsdefekten und geringerer Anzahl *J29* positiver Nuclei

Zwei der fünf Mutationen, die im Screen gefunden wurden, und weniger, bzw. auffällige axonale Faszikulationsdefekte zeigen, sind in Abb.27 exemplarisch dargestellt. Die Hauptaxontrakte des Segmental- und Intersegmentalnervs, die kommissuralen Fasern als auch die der Konnektive sind defaszikuliert (Pfeile Abb.27). Der Unterschied zwischen den beiden Mutanten ist, daß bei der Mutante *XIII-21E3* im PNS einige der peripheren Gliazellen zu fehlen scheinen (Pfeil Abb.27A linke Seite) während die *J29* positiven Nuclei in der Mutante *6-16E3* überwiegend in wildtypischer Anzahl vorhanden sind (Abb.27B linke Seite). Hier ist zu beobachten, daß die markierten Nuclei der peripheren Gliazellen sich mehr oder weniger „innerhalb“ der defaszikulierten Bereiche des Segmental- und Intersegmentalnervs befinden. Weitere Mutationen, die zu defaszikulierten axonalen Bereiche in ZNS und/oder PNS führen sind: *XII-13D1*, *XII-8E1* und *VII-17G8*.

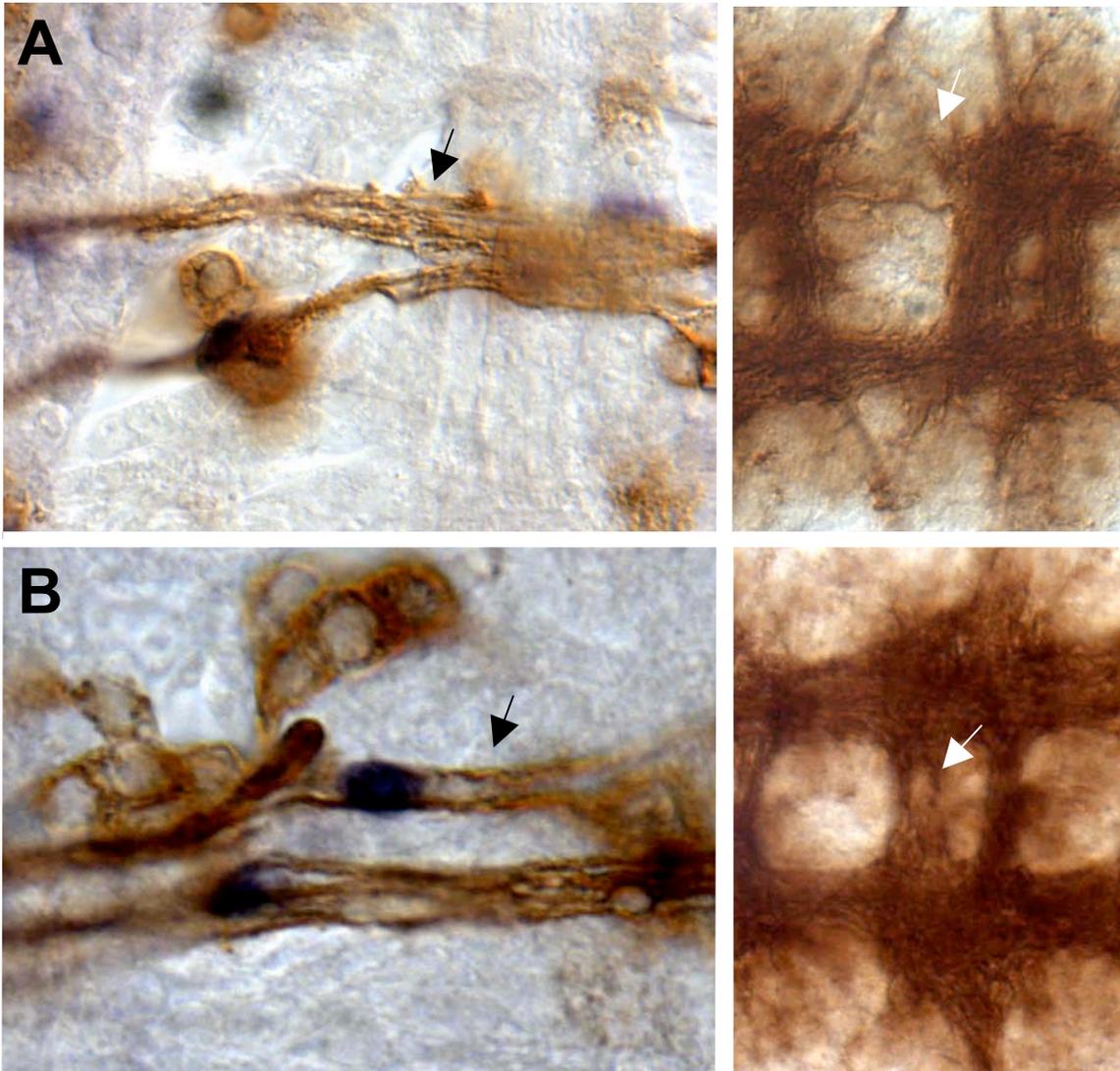


Abb.27: Mutationen mit Faszikulationsdefekten und geringerer Anzahl J29 positiver Nuclei

A *XIII-21E3* (anti-Futsch links; BP102 rechts) **B** *6-16E3* (anti-Futsch links; BP102 rechts)

Präparationen der Nervensysteme von Stadium 16 Embryonen. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Nuclei der peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion *J29* dargestellt. ZNS Axone wurden mit dem BP102 Antikörper markiert. *XIII-21E3* mutante Embryonen weisen weniger *J29* positive Zellen und defaszikulierte bzw. reduzierte Axonbündel (Pfeile **A**) auf. *6-16E3* mutante Embryonen zeigen die wildtypische Anzahl von *J29* positiven Zellen aber defaszikulierte Bereiche (Pfeile **B**). Phänotypen dieser Mutante sind exemplarisch für einige im Screen gefundene Mutanten (*XII-13D1*, *XII-8 E1*, *VII-17G8*, *1-5B2*).

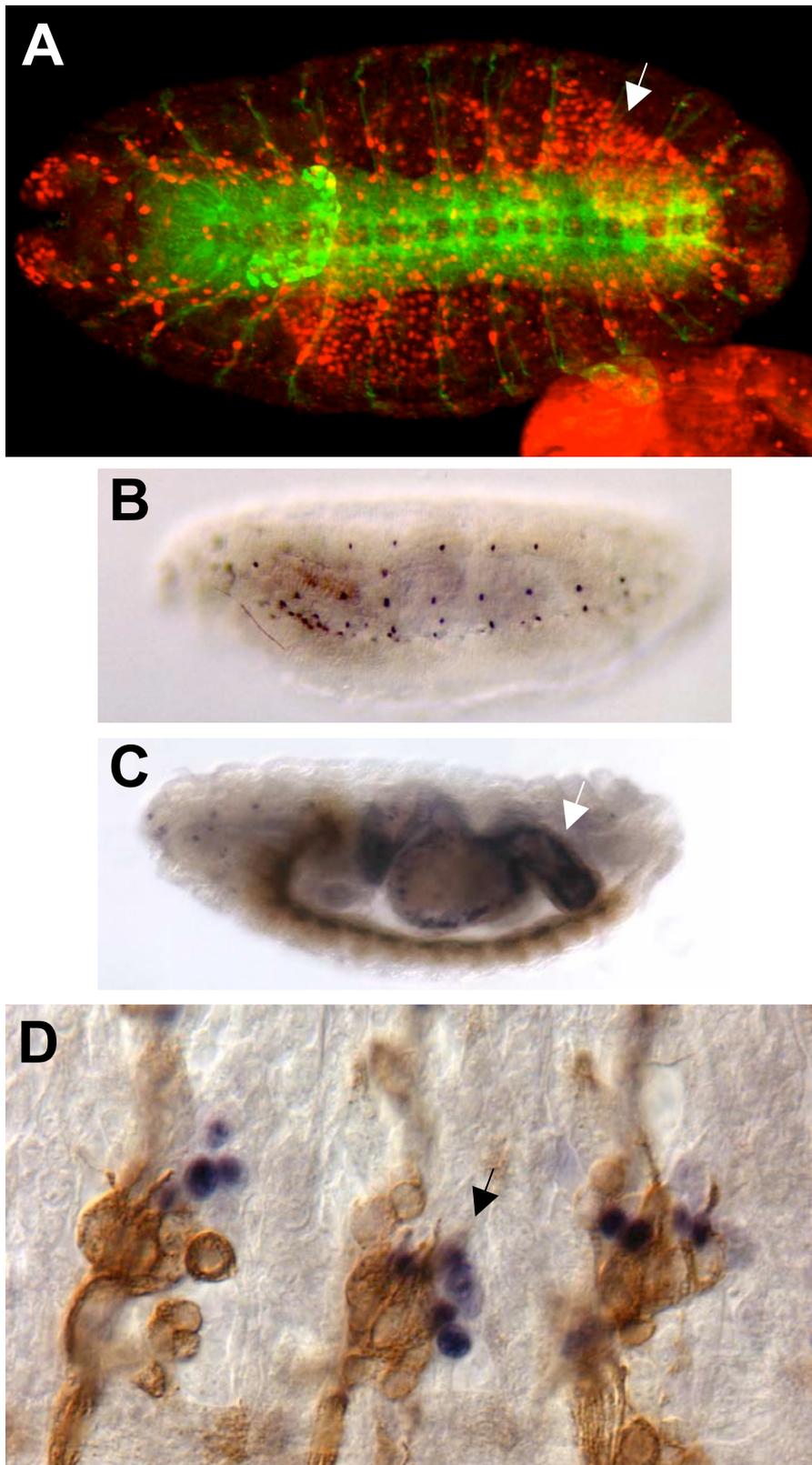


Abb.28: Ektopische Expression der J29 Enhancer trap Insertion

A V-8H7 *whole mount* Stadium 16 Embryo; konfokale Färbung in ventraler Aufsicht (anti-HRP in grün, J29 Expression in rot) **B** laterale Ansicht eines wildtypischen Embryos (*whole mount* Embryo Stadium 16) anti- β -Galaktosidase-Färbung zur Detektion der J29 Expression **C** laterale Ansicht eines XIII-21E3 mutanten Embryos (*whole mount* Embryo Stadium 16) BP102- und anti- β -Galaktosidase-Färbung zur Detektion der J29 Expression **D** XIII-21E3 PNS Präparation, Markierung der PNS Neurone via mAb anti-Futsch und J29 Expression

Ektopische Expression zeigte sich in Bereichen des Darms bei unterschiedlichen Mutanten (Pfeile **A** und **B**) und in XIII-21E3 mutanten Embryonen auch in den Oenocyten (Pfeil **C**).

3.6 Ektopische Expression der J29 Enhancer trap Insertion

In Abb.28 sind einige der Mutanten dargestellt, die eine ektopische J29 Expression in nicht-glialen Zellen innerhalb des Embryos zeigen. Besonders häufig findet sich diese Expression in unterschiedlichen Bereichen des Darms (Pfeile Abb.28A und B). In der Mutante *XIII-21E3* zeigt sich ektopische J29 Expression in den Oenocyten (Pfeil Abb.28C).

3.7 Klonale Analyse der X-chromosomalen Mutanten in der Augenimaginalscheibe

Zur weiteren Analyse der Gliamigration der isolierten Mutanten bietet sich ein weiteres System innerhalb von *Drosophila* an: das sich entwickelnde Auge. Da eine Prämisse des vorherigen Screen es war, embryonal letale Gene zu identifizieren, mußten für die Analyse in der Augenimaginalscheibe zunächst Stämme etabliert werden, die eine klonale Analyse ermöglichen (siehe Material und Methoden). Folgende der im Screen gefundenen Mutationen wurden mit einer *FRT19A* Insertion rekombiniert (die mit „A“ markierten Rekombinanten wurden durch A. Zierau hergestellt (Zierau, 2003)).

<i>VII-17G8 FRT19A</i>	<i>crn^{IX-15H6} FRT19A</i>	
<i>N^{B-8X} FRT19A</i>	<i>crn^{III-26H8} FRT19A</i>	A/G
<i>XII-14D1 FRT19A</i>	<i>wex^{6-8F3} FRT19A</i>	A
<i>V-8H7 FRT19A</i>	<i>wex^{4-20E1} FRT19A</i>	A/G
<i>VII-19H5 FRT19A</i>	<i>2-23D1 FRT19A</i>	
<i>XII-13D1 FRT19A</i>	<i>1-7B2 FRT19A</i>	A
<i>II-25E4 FRT19A</i>	<i>2-11X FRT19A</i>	A
<i>6-16E3 FRT19A</i>	<i>VIII-24E2 FRT19A</i>	

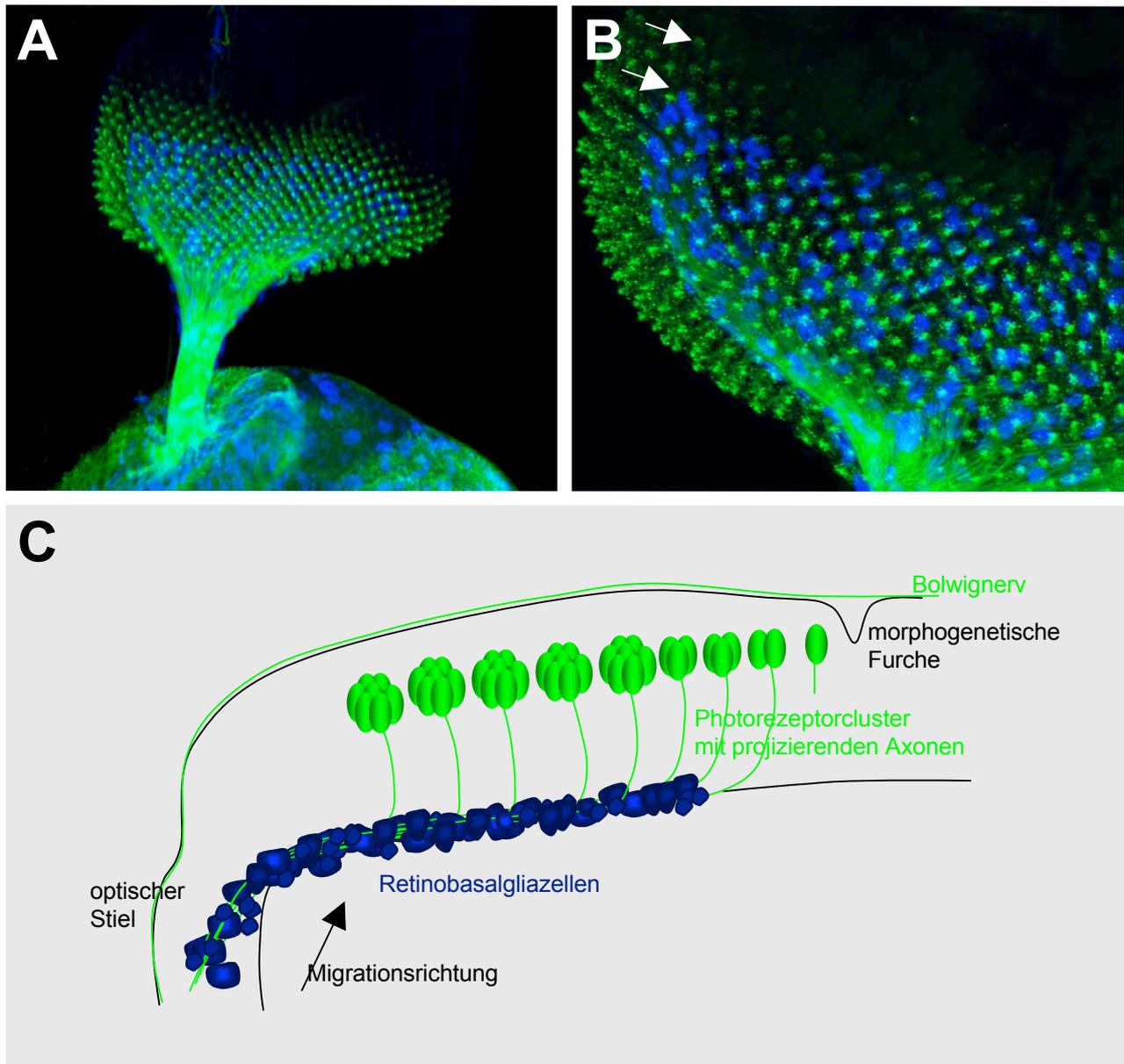


Abb.29: Wildtypische Migration und Verteilung der Retinobasalgliazellen in der Augenimaginalscheibe von *Drosophila melanogaster*

A Übersicht der Verteilung der Retinobasalgliazellen (RBG) in der Augenimaginalscheibe
B Detailansicht aus **A** **C** Schema der Gliazellmigration bzw. -verteilung in lateraler Ansicht (apikal ist oben, basal unten)

(**A** und **B**) Präparation der Augenimaginalscheibe mit assoziiertem optischen Lobus einer Larve des dritten Larvalstadiums. Anterior ist oben, der optische Lobus ist nach unten ausgerichtet. Konfokale Analyse des neuronalen Musters (anti-HRP in grün) und der Glianuclei (anti-Repo in blau). Die wildtypische Organisation der Photorezeptorneurone samt projizierender Axone sind in **A** und **B** dargestellt. Die Retinobasalgliazellen sind in diesem Stadium bereits von ihrem Entstehungsort über den optischen Stiel in die Augenimaginalscheibe einmigriert. Die Termination dieser Migration erfolgt im Wildtyp etwa drei bis vier Zellreihen hinter den sich entwickelnden Photorezeptorclustern (Pfeile **B**). Die laterale Ansicht in **C** zeigt die Verteilung der apikal positionierten Neurone mit ihren Axonen, die Richtung basal projizieren. Die Retinobasalgliazellen sind basal lokalisiert.

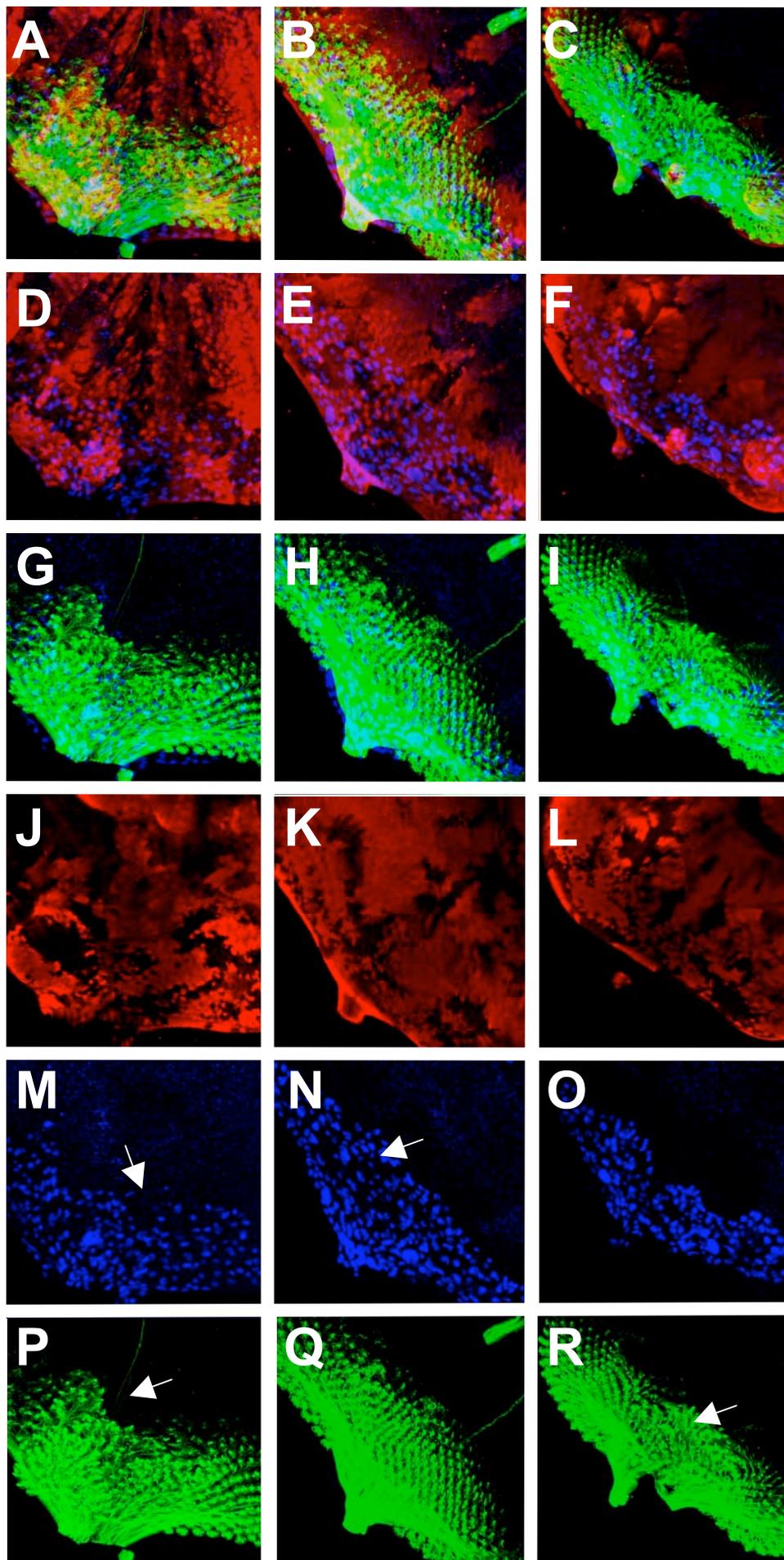


Abb.30: Konfokale Analyse von VII-17G8 mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe

Jede Spalte stellt eine Augenimaginalscheibe dar. Die Klone wurden mittels der ey-FLP Technik generiert. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glanzuclei mit anti-Repo in blau und nicht-mutante Bereiche sind via anti-GFP in rot markiert. Anterior ist oben. Details siehe Text.

3.7.1 Migration der Retinobasalgliazellen

Im Wildtyp beginnen früh im dritten Larvalstadium die Retinobasalgliazellen (RBG) von ihrem Entstehungsort aus im optischen Stiel in die Augenimaginalscheibe einzumigrieren (Abb.29). Sie orientieren sich dabei innerhalb der Augenimaginalscheibe entlang der Photorezeptoraxone, die an der basalen Seite der Augenimaginalscheibe in den optischen Stiel projizieren (Abb.29C). Sie schließen jedoch nicht mit der vordersten Front der Photorezeptorzellcluster auf, sondern verbleiben stets drei bis vier Zellreihen hinter den jüngsten Clustern und der morphogenetischen Furche (Pfeile Abb.29B; (Choi and Benzer, 1994)).

Dieses Migrationsverhalten der Retinobasalgliazellen und die Möglichkeit, durch Induktion von Klonen die betreffenden Gene in bestimmten Geweben ausschalten zu können, erlauben weitere Analysen. Durch die Wahl der FLP Rekombinase kann wie z.B. in den folgenden Experimenten durch die *eye/less*-FLP Rekombinase (*ey-Flipase*) ein klonales Ereignis spezifisch in der Augenimaginalscheibe und damit im Substrat für die migrierenden RBG erzeugt werden. Es kann untersucht werden, ob möglichen Migrationsphänotypen der Ausfall nicht zell-autonomer Genfunktionen zugrunde liegt.

3.7.2 Klonale Analyse der RBG Migration mit Hilfe *eye/less*-Flipase induzierter Klone

Die Ergebnisse der klonalen Analyse der Mutante *VII-17G8* sind in Abb.30 dokumentiert. Diese Abbildung als auch die folgenden (Abb.30 bis 34 einschließlich) sind gleich strukturiert. Jede der Spalten stellt eine Augenimaginalscheibe mit unterschiedlichen Einzelfärbungen bzw. Überlagerungen dieser dar: In der ersten Reihe ist eine Dreifachüberlagerung zu sehen. Die zweite kombiniert die anti-Repo Färbung, die die Glianuclei in blau markiert und die anti-GFP Färbung. Anhand der anti-GFP Färbung können nicht-klonale Bereiche markiert werden. Hierzu wurde zunächst eine *ubi-GFP* Insertion mit einem die *FRT19A* Insertion tragenden Chromosom rekombiniert. Neurone (über den anti-HRP Antikörper in grün) werden jeweils in der dritten Reihe zusammen mit den Glianuclei dargestellt. Die letzten drei Reihen sind Projektionen sowie (bei der Darstellung der Klongrenzen)

Einzelnschnittebenen der Einzelsignale.

In der Mutante *VII-17G8* ist in den Augenimaginalscheiben eine starke „Unordnung“ von Photorezeptorneuronen als auch Gliazellen zu erkennen. Die Axone sehen in einigen Bereichen wirbelartig verteilt aus, statt wie im Wildtyp relativ homogen gebündelt in den optischen Stiel zu münden (Pfeil Abb.30R). Der Bolwignerv ist zum Teil defaszikuliert (Pfeil Abb.30P). Die morphogenetische Furche bzw. die Front der jüngsten, rekrutierten Photorezeptorzellcluster ist unterbrochen, teils durch größere Kerben, was durch die ebenfalls eingebuchtete Gliamigrationsfront zu erkennen ist (Pfeil Abb.30M). Obwohl die RBG Nuclei auch im Wildtyp nicht immer gleichmäßig über die Augenimaginalscheibe verteilt sind, ist innerhalb der Augenimaginalscheibe eine unregelmäßige Verteilung der Gliazellen zu erkennen, in denen kleinere Flächen nicht so stark durch RBG besetzt zu sein scheinen (Abb.30N). Aus den Projektionen der dritten Reihe, die Neurone und Gliazellen zusammen darstellen, ist zu sehen, daß die Gliazellen trotz der offensichtlich aufgebrochenen Ordnung der Neurone in der gesamten Augenimaginalscheibe hinter diesen zurückbleiben. Weiterhin respektiert die RBG also die Grenze der Photorezeptorzellcluster. Eine genaue Korrelation der klonalen Bereiche mit Migrationsphänotypen der Gliazellen als auch mit den beschriebenen neuronalen Phänotypen ist nicht eindeutig erkennbar.

N^{B-8X} Augenimaginalscheiben weisen ähnliche neuronale Phänotypen auf wie in den zuvor beschriebenen *VII-17G8* mutanten Augenimaginalscheiben zu finden sind (Abb.31) - jedoch weniger stark ausgeprägt. Die Photorezeptoraxone sind ungeordnet (Pfeil Abb.31Q). Die Photorezeptorzellcluster direkt hinter der morphogenetischen Furche sind relativ geordnet - obwohl es auch hier Unregelmäßigkeiten gibt (Pfeil Abb.31P). Die RBG migrieren anders als im zuvor beschriebenen Beispiel in einigen Fällen sogar gleich in zwei Bahnen aus dem Bereich der sich differenzierenden Photorezeptorzellcluster in den anterioren Teil der Augenimaginalscheibe ein (Pfeil Abb.31M). Diese ektopische Migration kann jedoch nicht exakt mit klonalen bzw. nicht-klonalen Bereichen korreliert werden (vgl. Abb.31D und J). Dieser Phänotyp wurde auch mittels eines temperatursensitiven Allels von *Notch* generiert (Daten nicht gezeigt). In den in der zweiten und dritten Spalte gezeigten Augenimaginalscheiben ist die neuronale Differenzierung noch

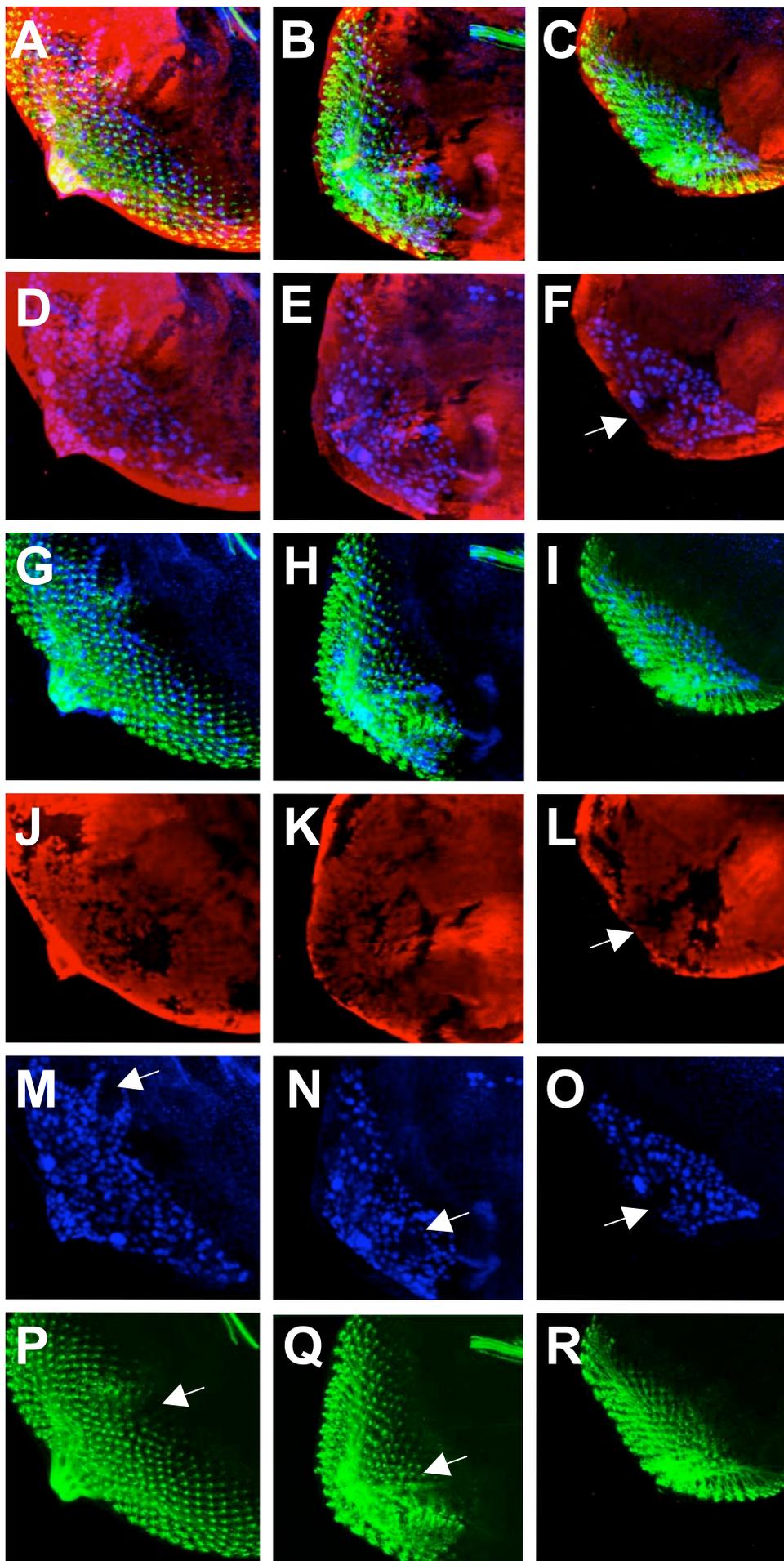


Abb.31: Konfokale Analyse von *NB-8X* mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe

Jede Spalte stellt eine Augenimaginalscheibe dar. Die Klone wurden mittels der *ey-FLP* Technik generiert. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glia nuclei mit anti-Repo in blau und nicht-mutante Bereiche sind via anti-GFP in rot markiert. Anterior ist oben. Details siehe Text.

nicht sehr weit vorangeschritten. Dennoch gibt es Bereiche, in denen innerhalb des posterioren Teils der Augenimaginalscheibe die Gliazellen nicht so regelmäßig wie im Wildtyp verteilt zu sein scheinen (Pfeile Abb.31N und O). Diese Bereiche decken sich auch mit klonalen Bereichen (Pfeil Abb.31L und F) aber nicht jeder klonale Bereich besitzt weniger Gliazellen.

Die Migration der RBG in den Augenimaginalscheiben *XII-14D1* mutanter Larven weist andere Defekte als in den bisher beschriebenen Beispielen auf (Abb.32). Die Entwicklung der Photorezeptorzellen und ihrer Axone scheint normal zu verlaufen. Die Cluster sowie ihre Anordnung wirken vollständig und die Projektion aller Axone ist posterior in Richtung des optischen Stiels orientiert (Abb.32K und L). Ein bis zu fünf Zellen breiter Block der RBG ignoriert die wildtypische Migrationsgrenze drei bis vier Zellreihen hinter den sich differenzierenden Photorezeptorzellclustern (Pfeil Abb.32I). Diese RBG wandern 8 bis 9 Zellreihen über die allgemeine Migrationsfront hinaus. Interessant ist, daß diese fehlmigrierende Gruppe der RGB sich genau entlang des Randes eines größeren klonalen Bereichs bewegt (Pfeile Abb.32C und G). Die im Vergleich etwas jüngere Augenimaginalscheibe in der rechten Spalte zeigt einen vergleichbaren Phänotyp, dessen ektopische Migration der RBG (in reduzierterem Maße) ähnlich mit einem klonalen Bereich zusammenfällt (Pfeile Abb.32D und H).

In *VII-19H5* mutanten klonalen Augenimaginalscheiben sind die Neurone regelmäßig positioniert und deren Axone projizieren relativ wildtypisch in den optischen Stiel. Es sind jedoch mit klonalen Grenzen korrelierende Bereiche zu finden, in denen weniger Gliazellen innerhalb der Augenimaginalscheibe vorhanden sind (vgl. Pfeile Abb.33C,D,I und J). Die RBG scheinen präferentiell entlang der nicht-klonalen Bereiche zu migrieren (Pfeil Abb.33H und J).

wex^{6-8F3} mutante, klonale Augenimaginalscheiben besitzen wie in *VII-17G8* mutanten Augenimaginalscheiben sehr ungeordnete Photorezeptorzellcluster (vgl. Abb 30 und Abb.34). Die morphogenetische Furche verläuft nicht kontinuierlich und die Axone scheinen unregelmäßig zu projizieren (Abb.34R). Die RBG migrieren sehr unterschiedlich weit in diesen Augenimaginalscheiben. Zum Teil migrieren sie als ganzes Band über die eigentliche Grenze der Photorezeptoren hinaus (Pfeil

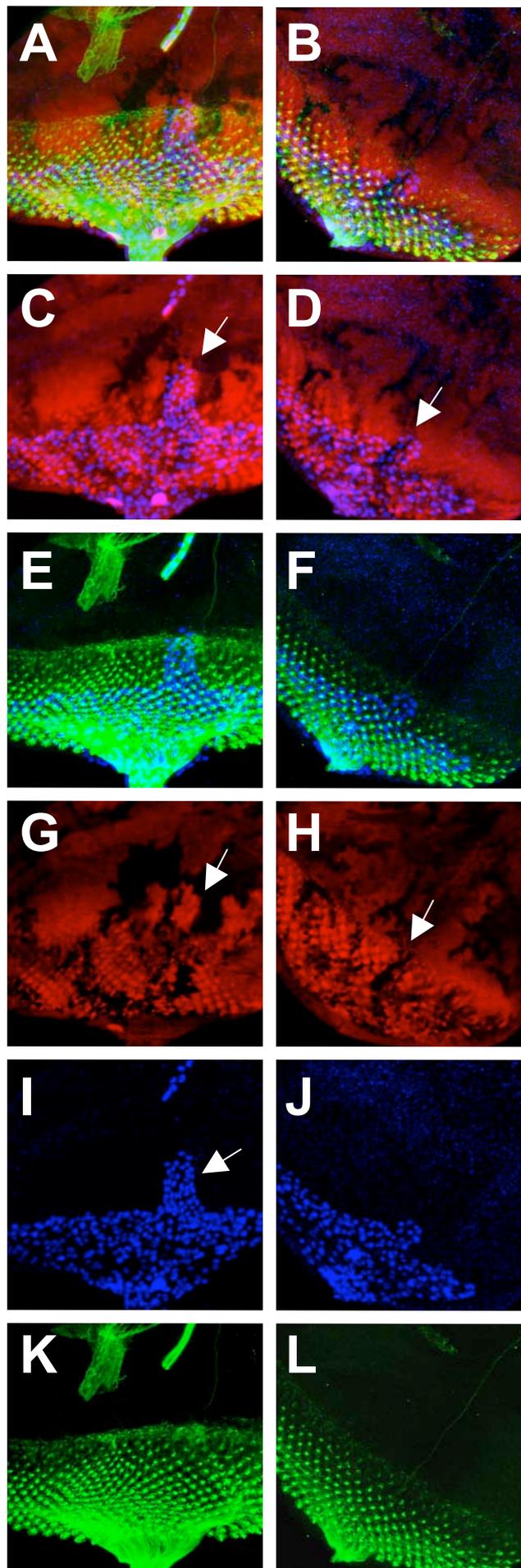


Abb.32: Konfokale Analyse von *XII-14D1* mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe

Jede Spalte stellt eine Augenimaginalscheibe dar. Die Klone wurden mittels der *ey-FLP* Technik generiert. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glianuclei mit anti-Repo in blau und nicht-mutante Bereiche sind via anti-GFP in rot markiert. Anterior ist oben. Details siehe Text.

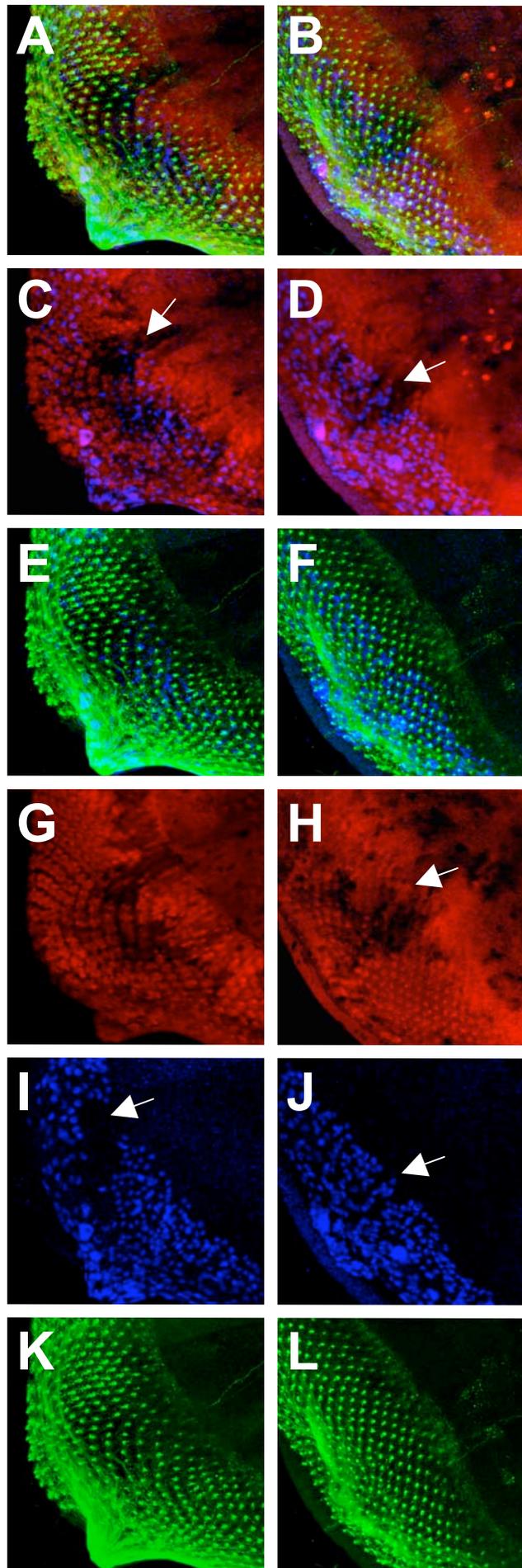


Abb.33: Konfokale Analyse von *VII-19H5* mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe

Jede Spalte stellt eine Augenimaginalscheibe dar. Die Klone wurden mittels der *ey-FLP* Technik generiert. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glianuclei mit anti-Repo in blau und nicht-mutante Bereiche sind via anti-GFP in rot markiert. Anterior ist oben. Details siehe Text.

Abb.34H) oder sie sind vereinzelt weiter anterior in der Augenimaginalscheibe zu finden (Pfeile Abb.34M und G).

In der Abb.35 sind schematisch die in der klonalen Analyse gefundenen RBG Phänotypen verschiedener Mutationen zusammengefaßt. Die schwarze Kontur soll die Augenimaginalscheibe skizzieren während die blaue Linie in jeder Augenimaginalscheibe die Migration der RBG darstellen soll. In Abb.35D sind RBG freie Bereiche durch den blauen Kreis innerhalb der Augenimaginalscheibe markiert. Diese Zusammenfassung der Klassen von Phänotypen stammt aus unterschiedlichen Ansätzen zur Erzeugung von *eyeless*-Flipase induzierten Klonen. Dabei wurden klonale Bereiche der Augenimaginalscheiben nicht in allen Fällen eindeutig markiert, so daß zwischen den Balancertieren und den die Mutation tragenden Augenimaginalscheiben nicht korrekt differenziert werden kann. Daten, in denen die Phänotypen der Gruppe B auftraten (Abb.35B), sind unter Vorbehalt zu betrachten, da sie durch den *FM7* Balancer (die *Bar* Mutation) hervorgerufen werden können, der auch einen solchen Phänotyp der Gliamigration aufweist (Daten nicht gezeigt).

Auf der anderen Seite ist es dennoch wahrscheinlich, daß die untersuchten Mutationen auch diesen Phänotyp zeigen, da dieser vermutlich einen allgemeinen, frühen Defekt in der Entwicklung der Augenimaginalscheibe widerspiegelt. Also könnten viele Gene bei Funktionsverlust in einem solchen (eher sekundären) Phänotyp resultieren. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, daß in einigen Fällen (wie nach *eyeless*-Flipase induzierten N^{B-8X} Klonen) neben „rauhem“ Augenphänotypen *Bar*-ähnliche, nierenförmige adulte Augen auftraten (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der Mutationen und die geringe Anzahl der analysierten Augenimaginalscheiben pro Mutation kann bis jetzt nur einen Ausblick auf eine zukünftige, umfassendere Analyse geben. Durch die erzielten Ergebnisse kann jedoch eine Selektion vorgenommen werden. In der Mutante *XII-14D1* z.B. treten - direkt benachbart zu klonalen Bereichen - spezifische Defekte auf. Die RBG migriert über die Grenze der Photorezeptoren hinaus (Abb.32).

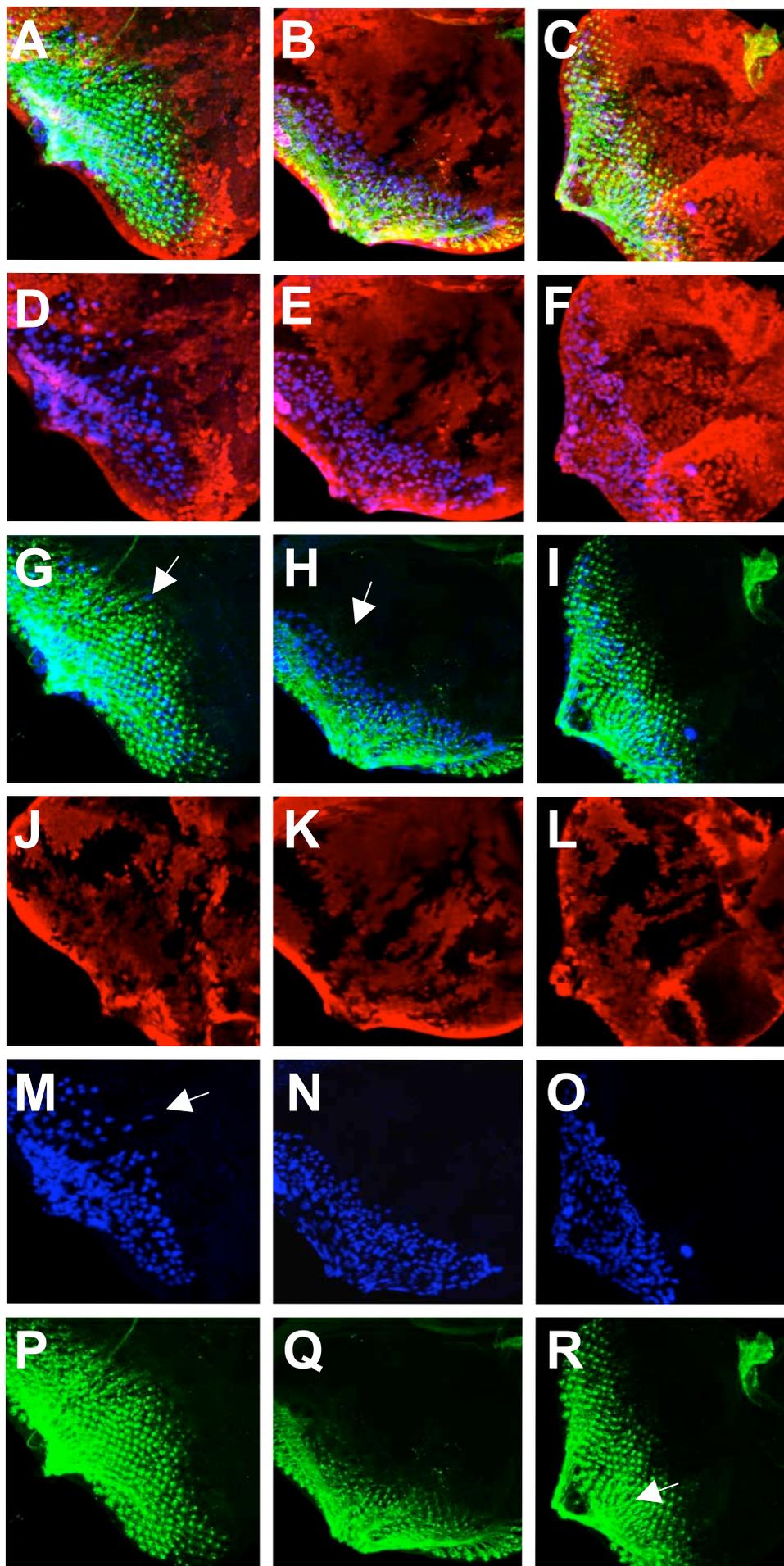


Abb.34: Konfokale Analyse von wex^{6-8F3} mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe

Jede Spalte stellt eine Augenimaginalscheibe dar. Die Klone wurden mittels der ey-FLP Technik generiert. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Gliazellen mit anti-Repo in blau und nicht-mutante Bereiche sind via anti-GFP in rot markiert. Anterior ist oben. Details siehe Text.

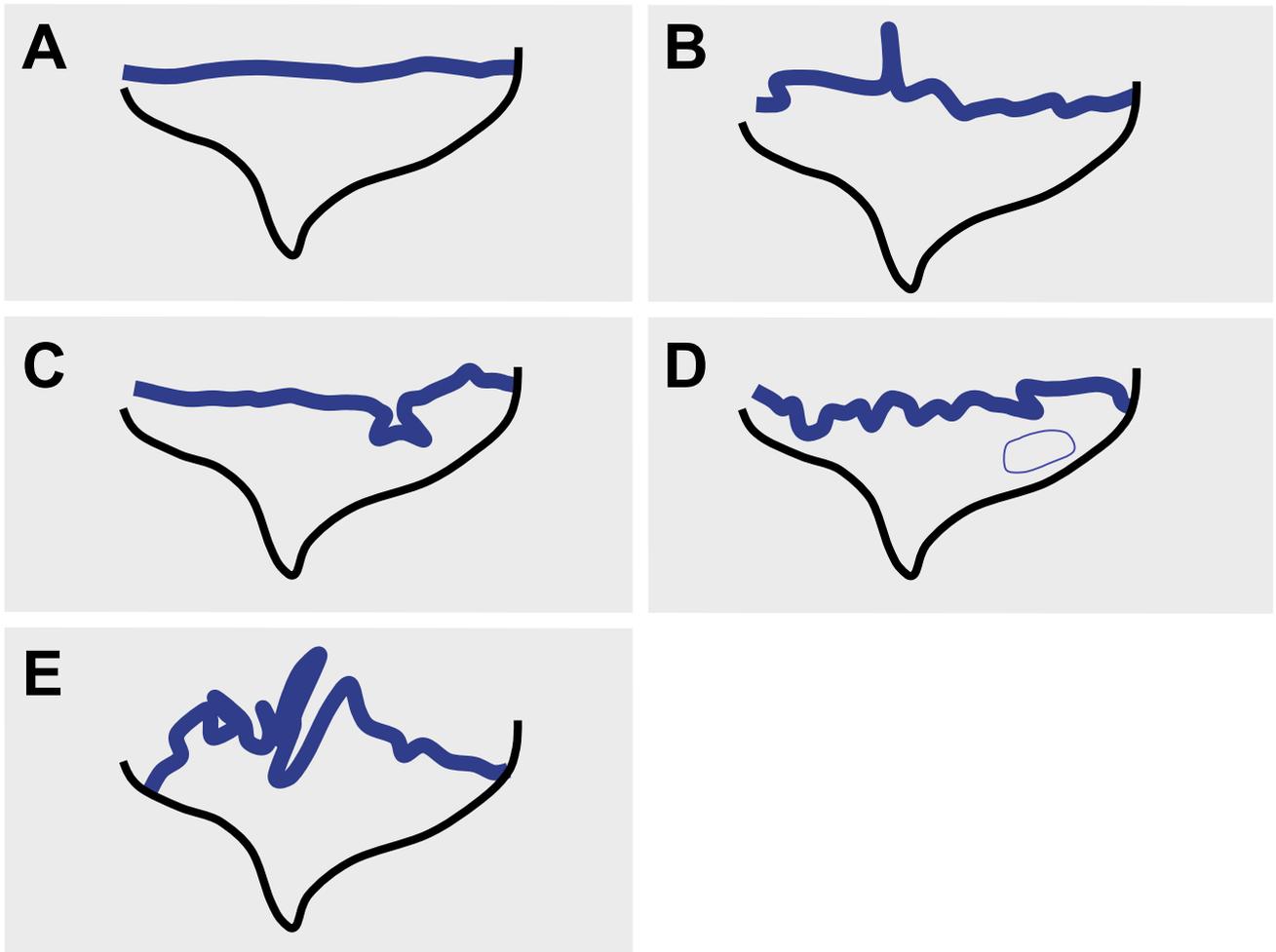


Abb.35: Schematische Zusammenfassung der Migrationsphänotypen der unterschiedlichen Mutanten

Schwarz skizziert ist die Kontur der Augenimaginalscheiben. Die blauen Linien stellen jeweilig die anteriorste Migrationsfront der Retinobasalgliazellen dar. Der blaue Kreis in D markiert einen gliazellfreien Bereich innerhalb der Augenimaginalscheibe.

Tabelle 3 Zusammenfassung der klonalen Analyse

Aufgelistet sind in der ersten Zeile die unterschiedlichen mutanten Stämme, mit denen die klonale Analyse in der Augenimaginalscheibe durchgeführt wurde. In der ersten Spalte aufgeführt sind die resultierenden Phänotypen (vgl. Abb.35). Die Kreuze bedeuten die Anzahl der Phänotypen pro Klasse bzw. analysierter Augenimaginalscheiben.

	Allel+ 19AFRT	VII-7G8	B-8X	XII-4D1	VII-19H5	XII-13D1	IX-15H6	III-26H8	6-8F3	4-20E1	VIII-24E2	2-11X	V-8H7
Wildtyp A						XX	XX	XXX					XXX
Phänotyp B			X	XXX	X	X		X			XX		
Phänotyp C					X				XX	X			
Phänotyp D	X	XX		X			X				X		
Phänotyp E	XX								X	XX		XXX	

3.8 Analyse der Gliazellmigration in *Notch* mutanten Embryonen

In dem Screen wurden insgesamt fünf *Notch* Allele identifiziert. Diese Mutanten wiesen unterschiedlich starke Defekte auf. Aufgrund der Tatsache, daß zwei der *Notch* Mutationen (N^{A-3E3} und N^{B-8X}) weniger stark neurogene Phänotypen aber auffällige Gliamigrationsphänotypen zeigen, wurde eine detailliertere Analyse durchgeführt.

3.8.1 Phänotypische Analyse der PNS- und Gliamigrationsdefekte *Notch* mutanter Embryonen

In Abb.36 sind die PNS- und Gliazellmigrationsdefekte *Notch* mutanter Embryonen dargestellt. Die Neurone des PNS wurden mit dem anti-Futsch

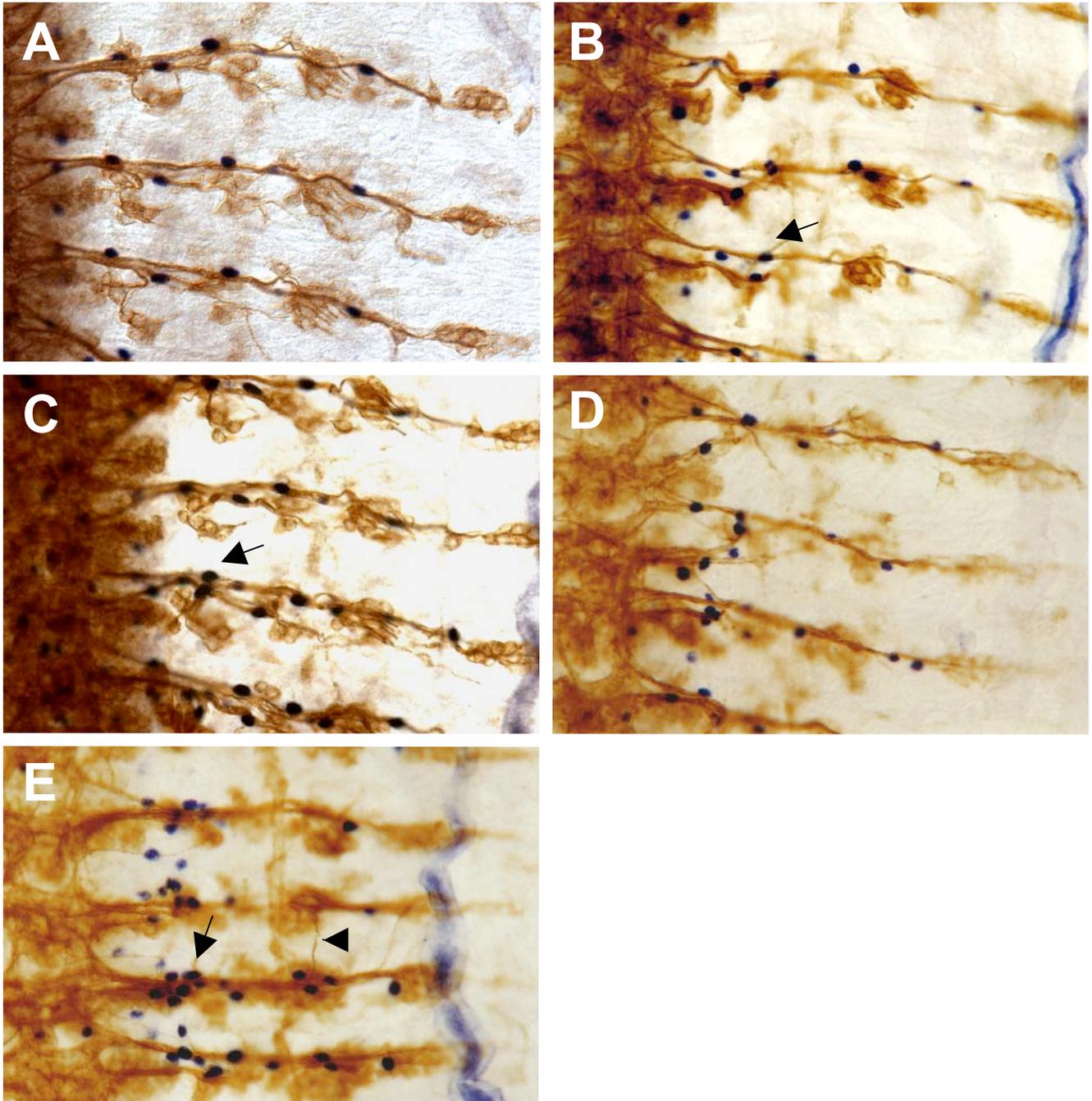


Abb.36: Migrations- und Differenzierungsdefekte der peripheren Gliazellen in *Notch* mutanten Embryonen

A Wildtyp **B und C** N^{B-8X} **D und E** N^{A-3E3}

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die Migration der peripheren Gliazellen mittels der Expression der Enhancer trap Insertion *J29* dargestellt. In mutanten N^{B-8X} Embryonen (ein stark hypomorphes *Notch* Allel) treten sowohl Migrationsdefekte (Pfeil **B** und **C**) als auch eine teils erhöhte Anzahl *J29* positiver Nuclei auf. Letzteres ist in N^{A-3E3} mutanten Embryonen oft zu beobachten; der neurogene Phänotyp ist deutlich zu sehen (Pfeil **D**). Zudem sind Projektionsdefekte des Intersegmentalnervs zu beobachten (Pfeilkopf **E**).

Antikörper markiert, die peripheren Gliazellen mittels der *J29* Expression sichtbar gemacht. N^{A-3E3} mutante Embryonen (Abb.36D und E) zeigen generell stärkere Defekte als N^{B-8X} mutante Embryonen (Abb.36B und C). In amorphen *Notch* mutanten Embryonen nehmen alle Zellen der neurogenen Region ein neuronales Zellschicksal an. Dies resultiert in einer Hyperplasie des Nervensystems (Lehmann et al., 1983). Die überzähligen Neuroblasten produzieren Gangliumutterzellen und folglich Neurone, die axonal projizieren (Menne and Klämbt, 1994). Das PNS der meisten N^{A-3E3} mutanten Embryonen weist überzählige Neurone und eine erhöhte Anzahl *J29* positiver Gliazellen auf (Pfeil Abb.36E). Die lateralen Gruppen sind vergrößert. Zudem treten Fehlprojektionen auf (Pfeilkopf Abb.36E). Für den Intersegmentalnerv wird diskutiert, daß die Axone dieses Nervs durch die beiden Transmembranproteine *Notch* und *Delta* geleitet werden. Hierbei soll die Expression von *Delta* auf einem der Tracheenzweige einen Weg für den Nerv durch den lateralen Teil des Embryos vorskizzieren. Die wachsenden Axone ihrerseits benutzen *Notch*, um diesen Weg zu finden (Giniger et al., 1993).

N^{B-8X} mutante Embryonen weisen selten neuronale Hyperplasie auf. In diesen Ablagen sind nur in einigen Fällen erhöhte Anzahlen *J29* positiver Gliazellen zu beobachten (Abb.36C). Dennoch migrieren Gliazellen teilweise unregelmäßig bzw. falsch. In Abb.36C markiert der Pfeil eine Gliazelle, die zu weit in der Peripherie lokalisiert ist. Der Pfeil in Abb.36B (ein Beispiel mit wildtypischer Anzahl *J29* positiver Gliazellen) deutet auf eine Gliazelle, die nicht weit genug im PNS – nicht unmittelbar unterhalb der Chordotonalorgane – positioniert ist. Wie bei vielen der im Screen identifizierten Mutanten verlaufen Segmental- und Intersegmentalnerv oft parallel, und die Gliazellen scheinen sich in diesen Raum fehl zu orientieren.

Um eine mögliche Funktion von *Notch* während der Migration der peripheren Gliazellen untersuchen zu können, wurde das temperatursensitive Allel N^{ts1} verwendet. Die Migration der peripheren Gliazellen findet spät während der Embryogenese in einem relativ engen Zeitfenster statt (Stadium 12 bis 16). Mittels des *ts* Allels sollte es möglich sein, die *Notch* Funktion im Zeitfenster der Gliazellmigration auszuschalten. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb.37 zusammengefaßt. Um die Position der peripheren Gliazellen in diesen Embryonen beurteilen zu können, wurden Stämme etabliert, die neben der N^{ts1} Mutation die

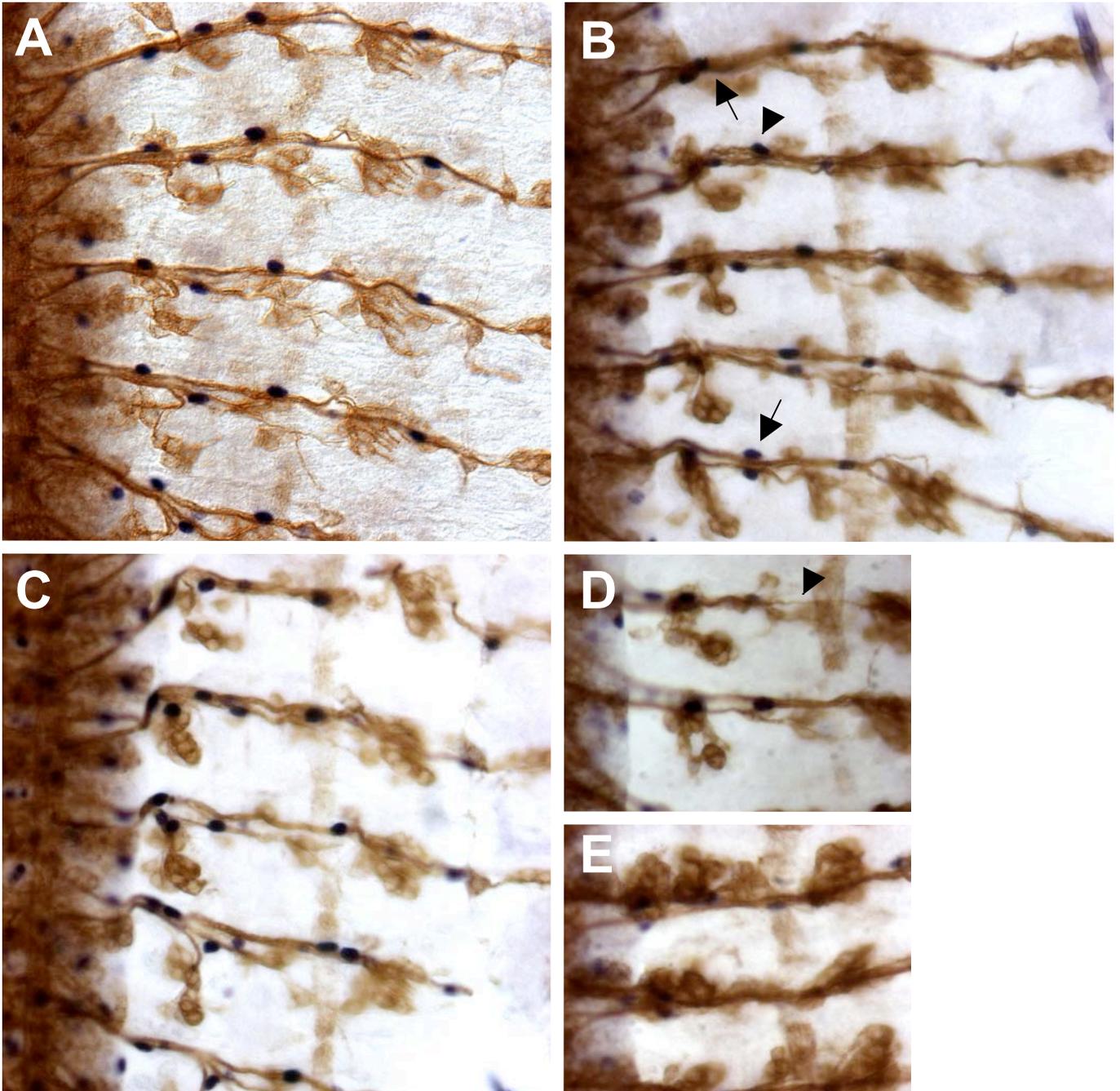


Abb.37: Migrations- und Differenzierungsdefekte der peripheren Gliazellen in *Notch^{ts}* mutanten Embryonen

A Wildtyp **B bis E** *N^{ts}* **D und E** *N^{ts}* Vergrößerung ZNS/PNS Übergangszone, ventrale und laterale Gruppen

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, die peripheren Gliazellen mittels der Enhancer trap Insertion *J29* dargestellt. Bei restriktiver Temperatur in bestimmten Zeitfenstern während der Embryogenese werden sowohl Migrationsdefekte (Pfeile **B**) als auch Differenzierungsdefekte (**C** und **E**) generiert. Die Pfeilköpfe in **B** und **D** weisen auf axonale Projektions- und Faszikulationsdefekte hin.

vitale *J29* Enhancer trap Insertion trugen. Eiablagen dieser Tiere wurden zunächst bei der permissiven Temperatur von 18°C alle zwei Stunden gesammelt. Die Embryonen wurden anschließend bei dieser Temperatur belassen, bis ein Großteil das Entwicklungsalter der jeweiligen Stadien (10, 11, 12 bzw. 13 und 14) erreicht hatte. Die Embryonen wurden dann auf die restriktive Temperatur von 30 bis 31 °C gebracht. Bei dieser Temperatur blieben sie bis zum Stadium 16 oder 17 (Ende der Embryogenese). Kontrollablagen, in denen Embryonen allein die *J29* Enhancer trap Insertion trugen, wurden denselben Temperaturwechseln unterzogen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Phänokopien der Migrationsdefekte der im Screen isolierten *Notch* Phänotypen generiert wurden (Abb.37B und C). Die Zeitfenster der Migration und die uneinheitlichen Entwicklungsalter der Embryonen innerhalb einer Ablage erlaubten keine eindeutige Korrelation mit den beobachteten Defekten. Wurden die Embryonen im Stadium 10 auf die restriktive Temperatur gebracht, resultierte in mehr Tieren neuronale Hyperplasie (Abb.37E) und eine erhöhte Anzahl *J29* positiver Zellen (Abb.37C). In den Ablagen von Embryonen, die in den Stadien 11 bis 12 auf die restriktive Temperatur gesetzt wurden, sind verstärkt Migrationsphänotypen zu sehen, wie sie in der Mutante N^{B-8X} beschrieben wurden (vgl. Abb.36B und Abb.37B). Die peripheren Gliazellen migrieren unregelmäßig. Die Pfeile in Abb.37B deuten auf unregelmäßig lokalisierte Gliazellen in zwei unterschiedlichen Segmenten desselben Embryos. Neben diesen Defekten konnten auch Projektionsdefekte der PNS Axone (Pfeilkopf Abb.37D) und Defaszikulationsdefekte beobachtet werden (Pfeilkopf Abb.37B).

3.8.2 Expression eines *Su(H)*/*lacZ* Reporterkonstruktes in peripheren Gliazellen

Auf die Ligandenbindung des Notch Rezeptors erfolgt eine intrazelluläre, proteolytische Prozessierung von Notch. Diese Prozessierung generiert ein intrazelluläres Notch Fragment (Notch intracellular domain fragment N^{ICD} bzw. N^{INTRA}). Diese Domäne transloziert in den Nucleus, wo sie als transkriptioneller Coaktivator mit *Su(H)* (Supressor of Hairless) – einem DNA bindenden Protein – interagiert (Lai, 2004; Schweisguth, 2004). Um zu untersuchen, ob in den peripheren Gliazellen Notch Signalwege aktiv sind, wurde ein *grh2,5–Su(H)x4–lacZ*

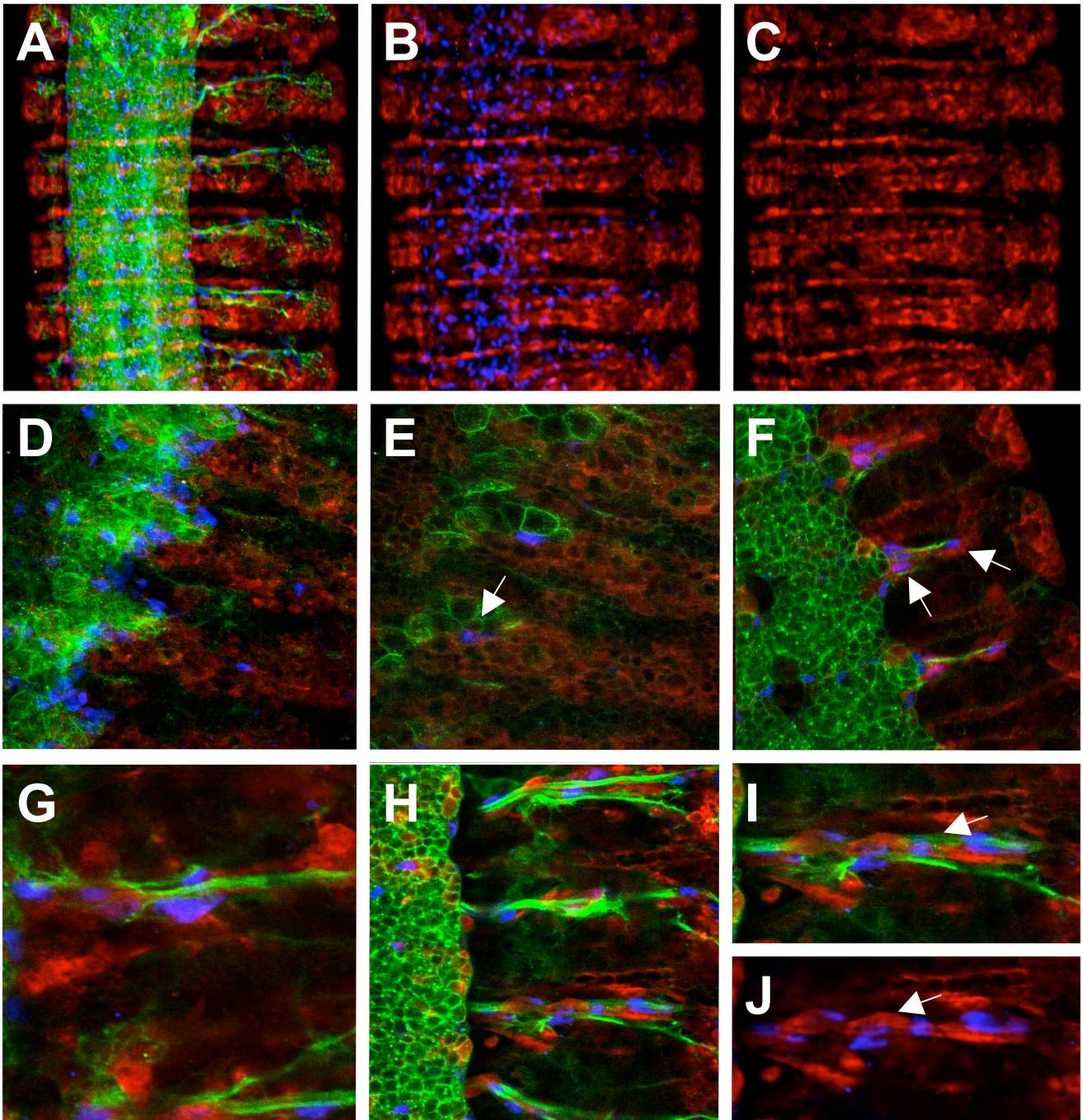


Abb.38: Konfokale Analyse der Expression eines *Su(H)/lacZ* Reporterkonstruktes während der Migration der peripheren Gliazellen in den peripheren Gliazellen

A bis C Stadium 16 *whole mount* Embryo Projektion **D** Stadium 11 Projektion Detail PNS/ZNS Übergangszone **E** Stadium 11 Detail Einzelebene **F** Stadium 12-13 Detail Einzelebene **G** Stadium 15 Detail Einzelebene **H** Stadium 15-16 Detail Einzelebene **I und J** Ausschnittsvergrößerung aus **H**

whole mount Embryonen unterschiedlicher Stadien; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS und ZNS Neurone wurde mit dem anti-HRP Antikörper in grün, die peripheren Gliazellen mittels anti-Repo in blau und die Expression des *Su(H)/lacZ* Reporterkonstruktes in rot dargestellt. Bis zum Stadium 12 ist wenig Expression des Reporterkonstruktes in den Gliazellen zu beobachten (Pfeil **E**). Mit beginnender Migration ist eine ansteigende *Su(H)/lacZ* Expression in den peripheren Gliazellen zu erkennen (Pfeile **F**). Stärkste Expression ist gegen Ende der Embryogenese in Stadium 16 zu beobachten (Pfeile **I** und **J**).

Reporterkonstrukt benutzt. (*Su(H)* ist ubiquitär exprimiert.) Das Reporterkonstrukt enthält *Su(H)* und Grainyhead (*Grh*) Bindungsstellen. In Zellen, in denen Notch Signalwege aktiv sind, kooperiert *Su(H)* mit *Grh* und Reporterexpression wird aktiviert (Bray and Furriols, 2001; Furriols and Bray, 2001; Fuss et al., 2004).

Eine Übersicht der Expression des Reporterkonstruktes im Stadium 15 gibt die obere Reihe in Abb.38. Neurone wurden mit dem anti-HRP Antikörper in grün markiert. Die Reporterkonstruktexpression ist in rot dargestellt und die peripheren Gliazellen sind durch den anti-Repo Antikörper markiert in blau abgebildet. Um analysieren zu können, ob eine Aktivierung von *Notch* in den peripheren Gliazellen vorhanden ist, wurden konfokale Stapel in hoher Auflösung aufgenommen und entweder als Projektion (Abb.38A bis D) oder Einzelebenen (Abb.38E bis J) dargestellt. Letztere bieten die Möglichkeit, genau in der Ebene der peripheren Gliazellen (anhand der Repoexpression) die *Su(H)* Reporterexpression zu untersuchen. Im Stadium 11 sind sehr geringe Expressionslevel des Reporterkonstruktes in Gliazellen zu detektieren (vgl. Abb.38D mit Pfeil in Abb.38E). Die Expressionslevel steigen wenig später und sind in den peripheren Gliazellen genau zu Beginn der Migration nachweisbar (Pfeile Abb.38F). Auch in weiter fortgeschrittenen Stadien der Migration ist die *lacZ* Expression des *Su(H)* Reporterkonstruktes in den peripheren Gliazellen sichtbar (Abb.38I und J). Eine Aktivität der *Notch* Signalwegs konnte so in peripheren Gliazellen während ihrer Migration nachgewiesen werden.

3.8.3 Überexpressionsstudien der intra- und extrazellulären Domäne von Notch und dem Liganden Delta

Um mögliche Funktionen von Notch für die peripheren Gliazellen weiter zu untersuchen, wurden verschiedene gliale Aktivatorlinien mit unterschiedlichen Notch Effektorlinien gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden auf Letalität, embryonale Phänotypen oder adulte Phänotypen untersucht. Wird die extrazelluläre Domäne von Notch überexprimiert (N^{EXTRA}), entspricht dies einem (schwachen) dominant Negativ zur Notch Funktion. Umgekehrt wird durch Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch (N^{INTRA}) ein „gain of function“ (ein Funktionsüberschuß) generiert.

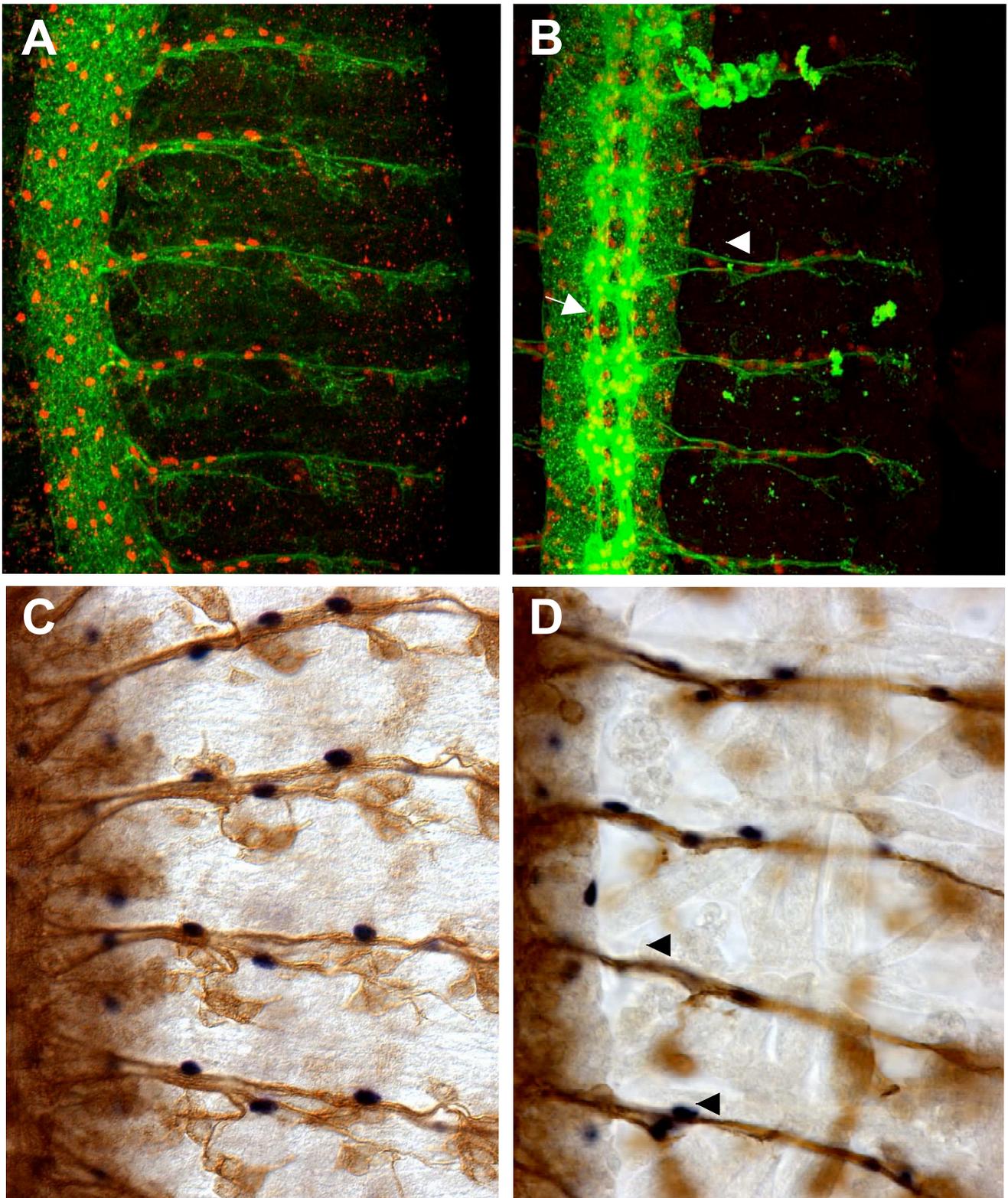


Abb.39: Überexpression der intrazellulären Domäne von *Notch* (*Notch^{INTRA}*) in lateralen Gliazellen via *loco* GAL4 resultiert in PNS, ZNS und Gliazellmigrationsdefekten

A Wildtyp *whole mount* Stadium 16 konfokale Färbung **B** *locoGAL4/UASNotch^{intra}* Stadium 16 *whole mount* konfokale Färbung **C** Wildtyp PNS Präparation Stadium 16 **D** *locoGAL4/UASNotch^{INTRA}* Stadium 16 PNS Präparation

Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS und ZNS Neurone wurde in **A** und **B** mit dem anti-HRP Antikörper in grün, die peripheren Gliazellen mittels anti-Repo in rot dargestellt. In **C** und **D** wurden die PNS Neurone mit dem mAb anti-Futsch, Gliazellen mittels der J29 Expression markiert. Es sind Migrationsdefekte der Gliazellen (Pfeilköpfe **B** und **D**) und teils auch reduzierte Konnektive zu erkennen (Pfeil **B**).

Die Expression von N^{EXTRA} in nur einem Subset der peripheren Gliazellen mittels der GAL4 Linien *MZ97* als auch *MZ317* führte zu einem adulten Phänotyp. Diese Phänotypen traten verstärkt bei einer Kultivierungstemperatur von 29°C auf, waren aber auch in Kombination mit der GAL4 Linie *MZ97* bei 25°C zu beobachten. Die Tiere, die es schaffen, das Puparium zu verlassen, sind sehr beschränkt bewegungsfähig und verenden dementsprechend oft im Futterbrei. Sie sind flugunfähig und können ihre Beine nicht koordiniert bewegen. Die Beine zittern so stark, daß sich die Tiere aus einer Rückenlage nicht wieder zügig in Normalposition retten können. Mittels *loco* GAL4 konnte eine larvale Letalität erzeugt werden (*loco* (A2) GAL4 und *loco* (A4) GAL4). In solchen Embryonen konnten jedoch keine Defekte oder abnorme Lokalisation der peripheren Gliazellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Überaktivierung durch Expression der intrazellulären Domäne von Notch mit den GAL4 Linien *loco* (A2) GAL4 und *loco* (A4) GAL4 induzierte in beiden Fällen eine frühe Letalität. In seltenen Fällen entwickelten sich Larven bis zum zweiten Larvalstadium. Überwiegend befanden sich tote Embryonen in den Kulturgefäßen. Diese Embryonen wurden durch Antikörperfärbungen auf Migrationsdefekte oder neuronale Defekte überprüft. Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb.39 zusammengefaßt. In einigen Embryonen treten deutliche ZNS Defekte auf (Pfeil Abb.39B). Die Konnektive sind verdünnt und die Kommissuren wirken leicht fusioniert. Im PNS verlaufen Segmental- und Intersegmentalnerv oft parallel. Wie durch die anti-Repo Antikörperfärbung zu sehen ist, treten in solchen Bereichen auch unregelmäßige Migrationen von Gliazellen auf (Pfeilkopf Abb.39B). In Abb.39D wurde die Lokalisation der peripheren Gliazellen anhand der *J29* Expression determiniert. Teilweise scheinen Gliazellen zu fehlen oder fehlpositioniert zu sein (Pfeilköpfe Abb.39D).

In Kombination des Effektorstammes UAS N^{INTRA} mit beiden GAL4 Linien *MZ97* und *MZ317* wurden keine Letalitäten oder embryonale bzw. adulte Phänotypen erzeugt. Die Überexpression eines UAS *Delta* Konstruktes mit der Aktivatorlinie *MZ97* GAL4 führte zu einer späten Letalität in den Nachkommen dieser Kreuzungen. Oft konnten an den Wänden der Kulturgefäße noch Puppen beobachtet

werden, die sich jedoch nicht weiter entwickelten. Weder Ablagen dieser Kreuzung noch Überexpression von Delta mittels *loco* GAL4 führten zu PNS oder Gliazelldefekten der Embryonen.

3.9 Analyse der Gliazellmigration in drittchromosomalen Mutanten

Neben den X-chromosomalen wurden auch drittchromosomale Mutationen auf einen Migrationsphänotyp der peripheren Gliazellen gesichtet. Diese Mutanten entstammen einer Mutagenese mit der Zielsetzung solche Gene zu identifizieren, deren Funktionsverlust zu einer Veränderung des embryonalen axonalen Musters führen (Hummel, 1998; Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Die Analyse der X-chromosomalen Mutanten hatte ergeben, daß 16 der 29 Stämme mit Gliazellmigrationsdefekten auch einen ZNS Phänotyp besitzen. Somit ist es wahrscheinlich, unter diesen drittchromosomalen Mutanten mit bereits beschriebenen Nervensystemdefekten auch solche zu identifizieren, die eine abnorme Migration der peripheren Gliazellen aufweisen.

Um die Lokalisation der peripheren Gliazellen in diesen Mutanten bestimmen zu können, wurde die Enhancer trap Insertion *J29* verwendet und transient in den Hintergrund der drittchromosomalen Mutationen gekreuzt. Im Blocksystem (siehe Material und Methoden) wurden die Stämme zur Ablage gebracht. Die peripheren Gliazellen und das neuronale Muster des Embryos wurden in Antikörperfärbungen über die *J29* Expression und den mAb anti-Futsch sowie den mAb BP102 markiert und auf Phänotypen unter dem Mikroskop gesichtet.

3.9.1 Kartierung der *jaywalker* Mutation

Zu vielen der drittchromosomalen Allele existieren Komplementations- und Kartierungsdaten. Daher wurden in dieser Arbeit die Mutanten genauer auf eine abnorme Migration der Gliazellen untersucht, die bereits in Komplementationsgruppen gefaßt waren (Daten nicht gezeigt). Die durch T. Hummel isolierten *jaywalker* Mutanten zeigen Defekte in der Migration der peripheren Gliazellen. Anfänglich war die Mutation cytologisch in den Bereich 86E-87C kartiert worden (Hummel, 1998). Dies konnte durch weitere Kreuzungen gegen Defizienzen,

die diesen Bereich abdecken, nicht bestätigt werden. Daher wurden alle verfügbaren drittchromosomalen Defizienzen zur Kartierung benutzt. Diese deckten bis dato etwa 80% des Genoms ab. Keine der zu dem Zeitpunkt vorhandenen Defizienzen zeigte eine Nichtkomplementation. Daraus folgte, daß das Gen in eine der Defizienzlücken kartieren mußte.

Durch die ektopische Expression der *J29* Enhancer trap Insertion in den Tracheenzellen der beiden *jaywalker* Allele (Pfeilköpfe Abb.42C) und durch Färbung des Tracheenlumen mittels des mAb 2A12 wurde der von Salzberg et al. beschriebene *jaywalker* Tracheenphänotyp bestätigt. In diesen mutanten Embryonen fehlt der dorsale Ast, und es sind lediglich „Endknöpfe“ dessen zu erkennen (Pfeilköpfe Abb.42C, (Salzberg et al., 1994)). Ausgehend von der Prämisse, daß es sich bei dem gesuchten Gen um ein für die Tracheenentwicklung essentielles Gen handeln mußte und dieses in einen nicht durch Defizienzen abgedeckten Bereich kartiert, wurden Literatur und Datenbanken durchsucht. Durch diese Überlegungen wurde schließlich u.a. das *tango*⁴ Allel getestet und komplementierte die beiden *jaywalker* Allele nicht. Die untersuchten *jaywalker* Mutanten entsprechen folglich *tango* Allelen. *tango* codiert einen bHLH-PAS Transkriptionsfaktor, der z.B. die ZNS- und Tracheenentwicklung im Embryo kontrolliert (Ohshiro and Saigo, 1997; Sonnenfeld et al., 1997; Zelzer et al., 1997).

3.9.2 Der ZNS Phänotyp *tango* mutanter Embryonen

In Abb.40 ist der ZNS Phänotyp *tango* mutanter Embryonen dargestellt. Durch die Markierung der ZNS Axone über den mAb BP102 wird sichtbar, daß in diesen Tieren die Konnektive zum Teil an der Mittellinie kollabieren (Pfeile Abb.40B). Die Kommissuren sind fusioniert, kein intrakommissuraler Raum ist zu sehen. Die kommissuralen Fasern scheinen in ihrer Anzahl jedoch nicht reduziert zu sein. Segmental- und Intersegmentalnerv kommen durch den Kollaps der Konnektive sehr nah zusammen. Es erscheint, als würden deren Endigungen sich an der Mittellinie treffen (Pfeil Abb.40D).

Diese ZNS Phänotypen wurden in solcher Stärke bis jetzt nicht für *tango* mutante Embryonen beschrieben. Das Gen *tango* wurde 1997 erstmals publiziert

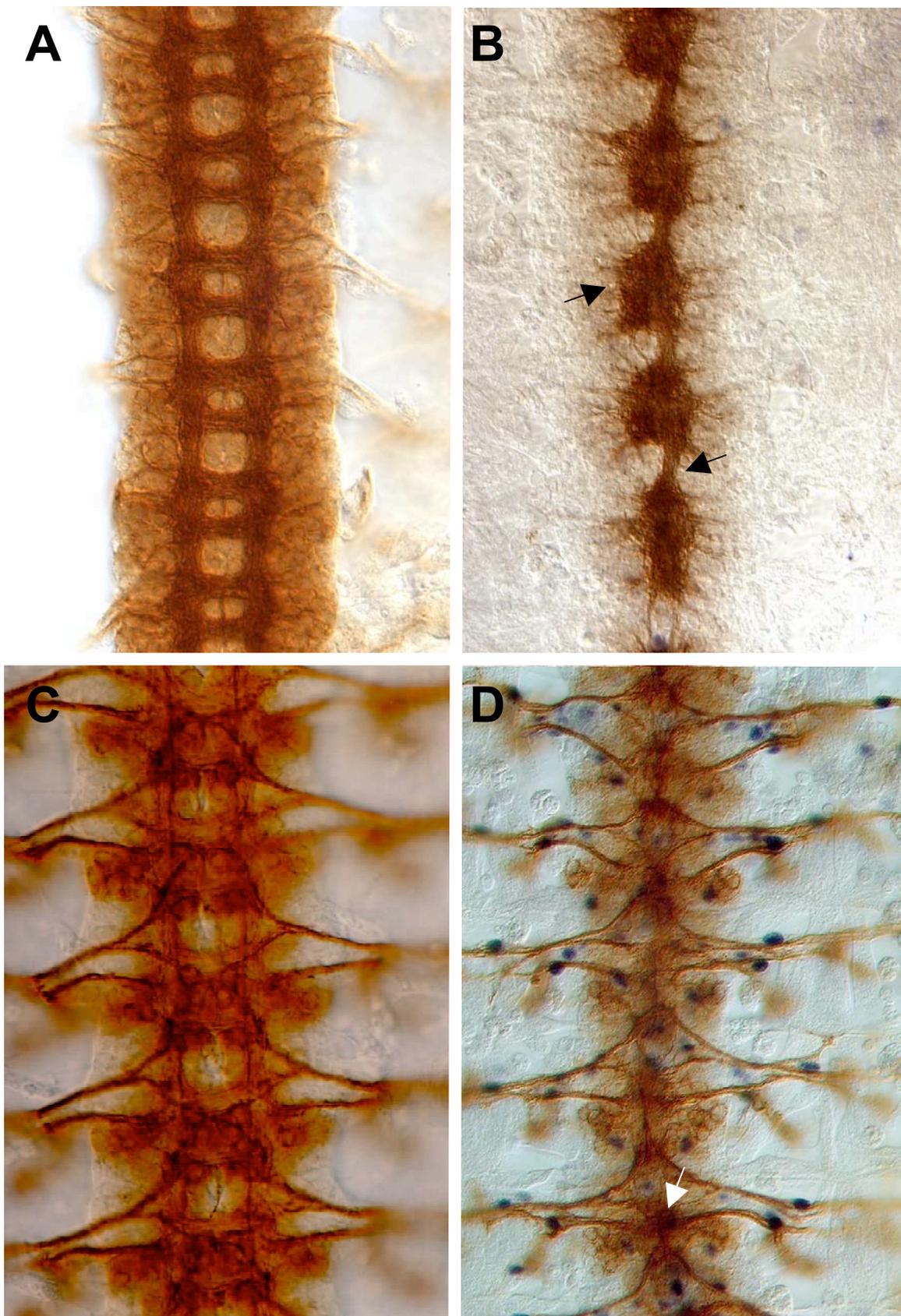


Abb.40: ZNS Phänotypen *tango* mutanter Embryonen

A und C Wildtyp **B** *tango*^{C8} **D** *tango*^{A1-042}

ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben. Das axonale Muster wurde in **A** und **B** mit dem mAb BP102 analysiert, in **C** und **D** mit dem mAb anti-Futsch. In *tgo* mutanten Embryonen kommt es zu einem Kollaps der Konnektive, während die Kommissuren stark fusioniert sind (Pfeile **B** und **D**). Es entsteht ein medianer Kollaps der longitudinalen Trakte, und Segmental- und Intersegmentalnerv scheinen sich an der Mittellinie zu treffen (Pfeil **D**).

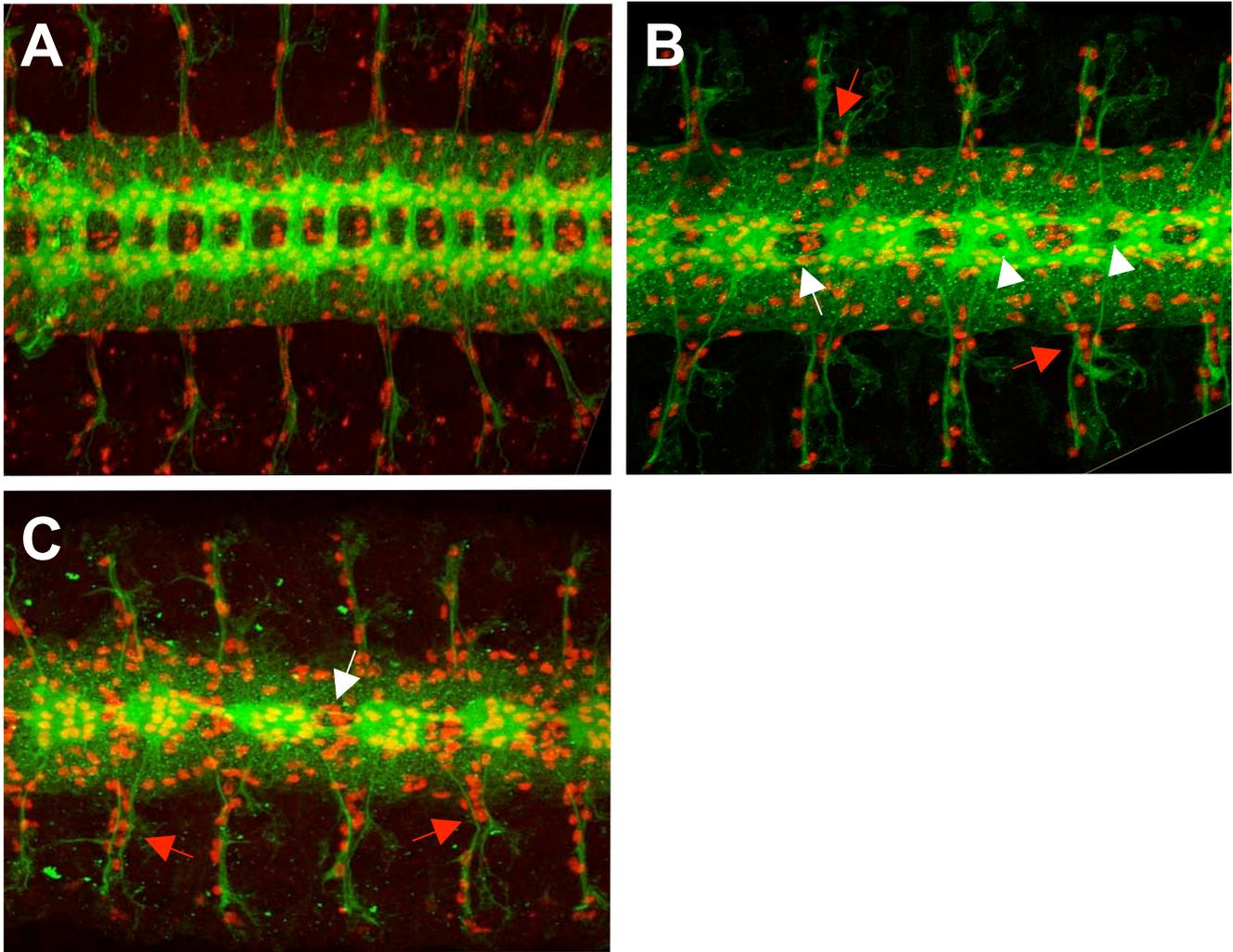


Abb.41: ZNS Phänotypen und Projektionsdefekte in *tango* mutanten Embryonen

A Wildtyp **B** *tango*⁴/*tango*^{C8} **C** *tango*^{C8}

Konfokale Färbungen von Stadium 16 *whole mount* Embryonen. Ventrale Ansicht; anterior ist links. Die Anordnung der ZNS Axone wurde mit dem anti-HRP Antikörper in grün, Gliazellen mittels anti-Repo in rot dargestellt. Der Kollaps der Konnektive in *tango*^{C8} mutanten Embryonen ist in Transheterozygose der beiden Allele *tango*⁴ und *tango*^{C8} weniger stark vorhanden (vgl. weiße Pfeile **B** und **C**). Die Fusion der Kommissuren ist ebenfalls schwächer. Es treten intrakommissurale Räume auf (Pfeilköpfe **B**). Die Projektionen des Segmental- und Intersegmentalnerv verlaufen oft parallel und bilden eine Lücke, in denen die peripheren Gliazellen oft fehlpositioniert sind (rote Pfeile **B** und **C**).

(Ohshiro and Saigo, 1997; Sonnenfeld et al., 1997; Zelzer et al., 1997). Der dort von Sonnenfeld et al. identifizierte *tango* mutante ZNS Phänotyp ist sehr viel schwächer. Die Konnektive sind reduziert, und die Kommissuren sind desorganisiert aber nicht stark fusioniert. Die Autoren führen dies u.a. auf die hypomorphe Natur des verwendeten *tango* Allels zurück (Sonnenfeld et al., 1997). In Abb.41B sind die ZNS Phänotypen transheterozygoter *tango*⁴/*tango*^{C8} Embryonen dargestellt: Die Konnektive sind verdünnt und enger zur Mittellinie lokalisiert (Pfeil Abb.41B) und die Kommissuren sind stark fusioniert - nur in einigen Segmenten ist noch ein intrakommissuraler Raum zu beobachten (Pfeilköpfe Abb.41B). Dieser Phänotyp ist schwächer als der *tango*^{C8} homozygot mutanter Embryonen (vg. Abb.40B mit Abb.41B und C) aber wesentlich stärker und penetranter ausgeprägt als der *tango*⁴ homozygot mutanter Embryonen (Daten nicht gezeigt).

Außerdem haben Sonnenfeld et al. eine Reduktion der Mittelliniengliazellen und Mittellinienneurone in *tango* mutanten Embryonen beschrieben. Zur Bestimmung der Anzahl der Mittelliniengliazellen wurde die Expression der Enhancer trap Insertion AA 142 benutzt. Eines der hier benutzten *tango* Allele (*tango*^{C8}) trägt ebenfalls diese Insertion, so daß die Mittelliniengliazellen markiert werden können (Abb.42B). In diesen Tieren konnte jedoch keine Reduktion der Zahl der Mittelliniengliazellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.9.3 Gliale Migrations- und neuronale Defekte in *tango* mutanten Embryonen

Durch die *J29* Expression konnten die *tango* mutanten Embryonen auf Gliazelldefekte gesichtet werden. Die Anzahl *J29* positiver Gliazellen in diesen Tieren ist wildtypisch. Auch durch Markierung aller peripheren Gliazellen mit dem anti-Repo Antikörper konnte keine Abweichung von der wildtypischen Anzahl beobachtet werden (Abb.43B). Die Lokalisation der *J29* positiven Zellen ist unregelmäßig (Abb.41 und 42). Nicht nur die Position der Gliazellen variiert, auch ihre Lokalisation in Zwischenräumen, die durch den Segmental- und Intersegmentalnerv gebildet werden. Wie schon erwähnt, projizieren Segmental- und Intersegmentalnerv in vielen der gesichteten Mutanten (und auch in *glial cells missing* mutanten Embryonen) nicht wildtypisch, sondern verlaufen eher parallel zueinander (rote Pfeile Abb.41). Die peripheren Gliazellen sind oft in diesen

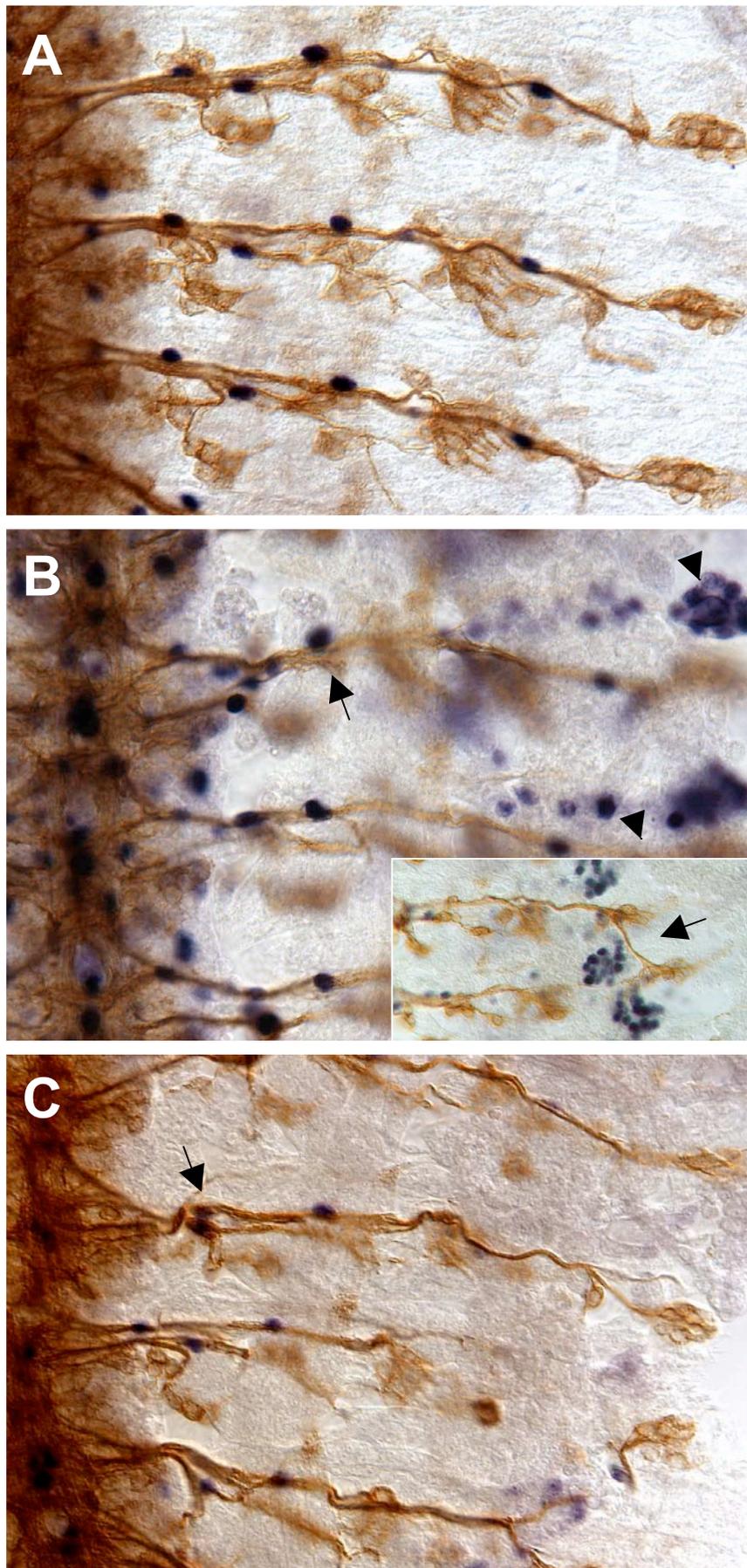


Abb.42: Migrationsdefekte der peripheren Gliazellen in *tango* mutanten Embryonen

A Wildtyp **B** *tango^{C8}* **C** *tango^{A1-042}*

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem mAb anti-Futsch, Gliazellen mittels der *J29* Expression markiert. Die peripheren Gliazellen in *tango* mutanten Embryonen migrieren unregelmäßig (Pfeile **B** und **C**). Ektopische *J29* Expression ist in den Tracheen zu beobachten (Pfeilköpfe **B**). Der Ausschnitt in **B** zeigt charakteristische Projektionsdefekte *tango* mutanter Embryonen.

Bereichen fehllokalisiert (rote Pfeile Abb.41). In Abb.42B und C sind PNS Präparationen dargestellt; die Pfeile deuten auf periphere Gliazellen in nicht-wildtypischen Positionen. Der Phänotyp ist nicht sehr penetrant ausgeprägt; in vielen Segmenten *tango* mutanter Embryonen scheinen die peripheren Gliazellen wildtypisch zu migrieren (vgl. Abb.42B mit Abb.43B). Die Ausprägung des glialen Migrationsphänotyps ist dabei unabhängig von der Stärke des jeweiligen ZNS Phänotyps (Daten nicht gezeigt). Durch die ektopische *J29* Expression in den Tracheen kann, wie bereits beschrieben, der Tracheenphänotyp *tango* mutanter Embryonen erkannt werden (Pfeilköpfe Abb.42B). Der dorsale Ast ist nicht vorhanden. Er endet vielmehr in kleinen „Endknöpfen“ auf gleicher Höhe der dorsalen Gruppe (Pfeil, Abb.42B).

Das PNS *tango* mutanter Embryonen zeigt deutliche Projektionsdefekte der Hauptaxontrakte. Die Anzahl der PNS Neurone scheint keine Abweichungen zum Wildtyp aufzuzeigen. Die Fehlprojektionen betreffen zum einen - wie beschrieben - die Positionierung der Hauptaxontrakte bei Verlassen des ZNS. Andere charakteristische Fehlprojektionen sind in etwa einem Drittel der *tango* mutanten Embryonen zu beobachten und trugen zur Namensgebung des Gens *jaywalker* (unachtsamer Fußgänger) bei (Salzberg et al., 1994). Der Intersegmentalnerv projiziert oft über die Segmentgrenzen hinweg (Pfeil rechter Kasten Abb.42B) und faszikuliert dann mit dem Intersegmentalnerv des benachbarten Segments. Dies geschieht entweder oberhalb der dorsalen Gruppe oder auf Höhe der lateralen sensorischen Gruppen.

3.9.4 Expression eines dominant Negativs zur Tango Funktion resultiert in Gliamigrationsdefekten

Das Gen *tango* codiert einen Transkriptionsfaktor, der als DNA Bindungsdomäne eine bHLH (basic Helix Loop Helix) Domäne enthält. (Die Tango Proteinstruktur wird im nächsten Kapitel detaillierter beschrieben.) Es standen zwei Stämme zur weiteren Analyse zur Verfügung: ein UAS *tango* Konstrukt und ein dominant Negativ zur Tango Funktion, UAS *tgo DN* (Ohshiro and Saigo, 1997; Ward et al., 1998). Letzteres enthält die komplette *tango* cDNA aber eine funktionsunfähige DNA Bindungsdomäne (Ohshiro and Saigo, 1997). Die

Ergebnisse der Überexpression dieser Konstrukte sind in den Abb.43 und 45C dargestellt.

Die Überexpression der *tango* cDNA via *loco* GAL4 induziert keine Letalitäten oder embryonale Gliazellmigrationsphänotypen. Die Expression des *tgo DN* Konstruktes führt in einigen Geweben zu letalen Konsequenzen (Tabelle Abb.45C). Mit den gliaspezifischen Aktivatorlinien *MZ97* GAL4 und *repo* GAL4 konnte keine Letalitäten erzeugt werden, und es wurden keine abnormen Migrationsphänotypen festgestellt. Die Expression des *tgo DN* Konstruktes mittels der stärker exprimierenden Aktivatorstämme *loco* A4 und A2 GAL4 resultiert in frühlarvaler Letalität. Die Embryonen solcher Kreuzungen zeigen Migrationsdefekte der peripheren Gliazellen (Abb.43). Die Gliazellen migrieren unregelmäßig vergleichbar mit *tango* mutanten Embryonen aber oft sind alle Gliazellen nicht weit genug in der Peripherie lokalisiert (Pfeile Abb.43C und D).

Der *loco* GAL4 Aktivator induziert die Expression hauptsächlich in den lateralen Gliazellen aber auch in den Tracheen, Muskeln und im Darm. Daher ist es auch denkbar, daß die Letalität, die nach *loco* GAL4 vermittelter Expression des *tgo DN* Konstruktes beobachtet wurde, durch den Ausfall der Tango Funktion in diesen Geweben herrührt. Um dies zu untersuchen, wurde der *btl* (*breathless*) GAL4 und der *24B* GAL4 (muskelspezifisch) Aktivatorstamm benutzt. Expression des *tgo DN* Konstruktes induziert mittels beider Aktivatoren Letalität (Abb.45C). Über den muskelspezifischen Aktivator wird Letalität erst in späteren Stadien der Larval- bzw. Pupalentwicklung induziert. Die Letalität der *loco* GAL4/UAS *tgo DN* mutanten Embryonen könnte daher auch in der trachealen Expression der *loco* GAL4 Linie begründet sein.

Eine mögliche Tango Funktion während der Migration der Retinobasalgliazellen (RBG) in der Augenimaginalscheibe wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde das *tgo DN* Konstrukt in der Augenimaginalscheibe mit *ey* GAL4 und in den RBG mit *loco D2* GAL4 exprimiert. Die Expression des *tgo DN* Konstruktes mit dem Aktivator *loco D2* GAL4 führt auch zu adulten Tieren und nur in einem Teil der Nachkommen zur Letalität (Abb.45C). Die Migration der RBG in Larven des dritten Larvalstadiums der Nachkommen dieser Kreuzungen wurde

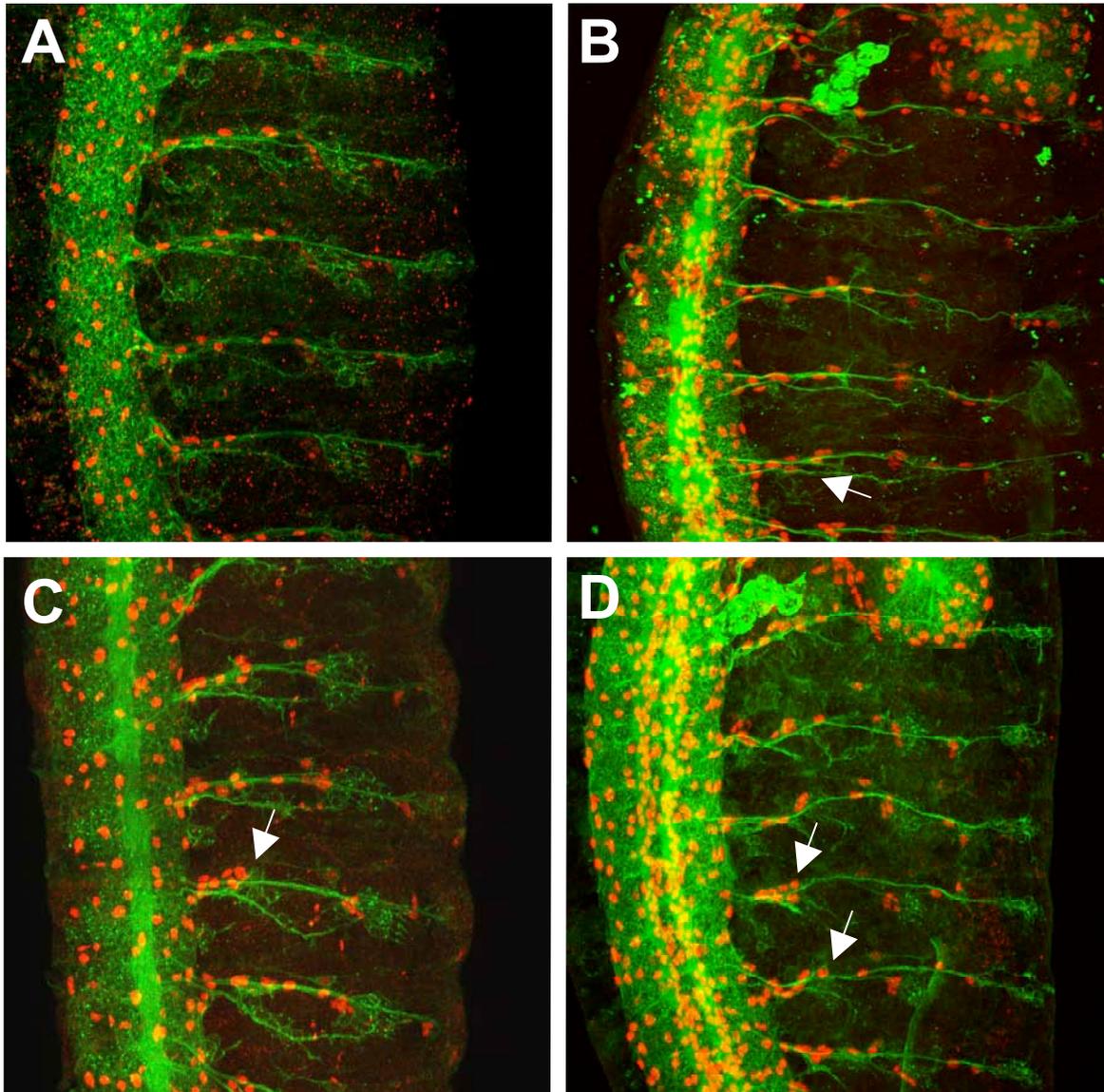


Abb.43: Überexpression eines dominant negativ wirkenden Tango Proteins mittels *loco* GAL4 resultiert in Gliamigrationsdefekten

A Wildtyp **B** *tango*^{C8} **C** und **D** *loco*GAL4/UAS *tango* DN

whole mount Stadium 16 konfokale Färbungen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS und ZNS Neurone wurde mit dem anti-HRP Antikörper in grün, die Gliazellen mittels anti-Repo in rot dargestellt. Die Expression des *tango* DN Konstrukts mittels des Aktivatorstamms *loco* GAL4 resultiert in frühlarvaler Letalität. Ablagen dieser Kreuzungen enthalten Embryonen, in denen periphere Gliazellen ähnlich wie in *tango* Mutanten unregelmäßig bzw. nicht weit genug in der Peripherie lokalisiert sind (vgl. Pfeile **B,C** und **D**).

mittels der Repoexpression untersucht. Es konnte keine Fehlmigration der RBG beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine klonale Analyse, in der mittels *eye/less*-Flipase über das FRT/FLP System *tango* mutante Klone in der Augenimaginalscheibe generiert wurden, zeigte keine Fehlmigration der RBG (Daten nicht gezeigt).

3.9.5 Struktur und Lokalisation des Tango Proteins

3.9.5.1 Struktur des Tango Proteins

In Abb.45A ist die Struktur des Tango Proteins schematisch dargestellt. *tango* codiert einen bHLH-PAS Transkriptionsfaktor (Ohshiro and Saigo, 1997; Sonnenfeld et al., 1997; Zelzer et al., 1997). Die bHLH DNA Bindungsdomäne (rot) ist nahe dem N-Terminus lokalisiert, gefolgt von der PAS Interaktionsdomäne, die in zwei Subdomänen PAS A (hellblau) und PAS B (grün) unterteilt ist. Innerhalb beider Subdomänen befindet sich ein sog. PAS repeat (PR). In der C-terminalen Region gibt es Glutamin-reiche Regionen und ein sog. Paired (PRD) Repeat (blau) mit Histidin-/Prolin-reichen Bereichen mit bislang unbekannter Funktion. *Drosophila* Tango ist ein Ortholog des Arnt Proteins (aryl hydrocarbon nuclear translocator receptor) der Mammalia und wird daher auch als *Drosophila* Arnt bezeichnet.

3.9.5.2 Lokalisation des Tango Proteins

Die Analyse der Tango Proteinexpression ist in Abb.44 dargestellt. Die oberste Reihe der Abbildungen zeigt einen Vergleich der Tango Expression in *tango* Mutanten zur Expression in Balancertieren. Es ist zu sehen, daß in *tango*^{A1-042} mutanten Embryonen kein Tango Protein über den anti-Tango Antikörper detektiert werden kann (Pfeil Abb.44A). Die Expression in dem Balancertier ist deutlich zu sehen (Abb.44A). *tango*^{A1-042} mutante Embryonen können von den Balancertieren anhand des ZNS Phänotyps und der fehlenden β -Galaktosidaseexpression unterschieden werden (Pfeile Abb.44B und C).

Generell ist das Tango Protein cytoplasmatisch relativ ubiquitär im Embryo lokalisiert (Abb.44D bis G in blau dargestellt, (Sonnenfeld et al., 1997)). Nucleär ist

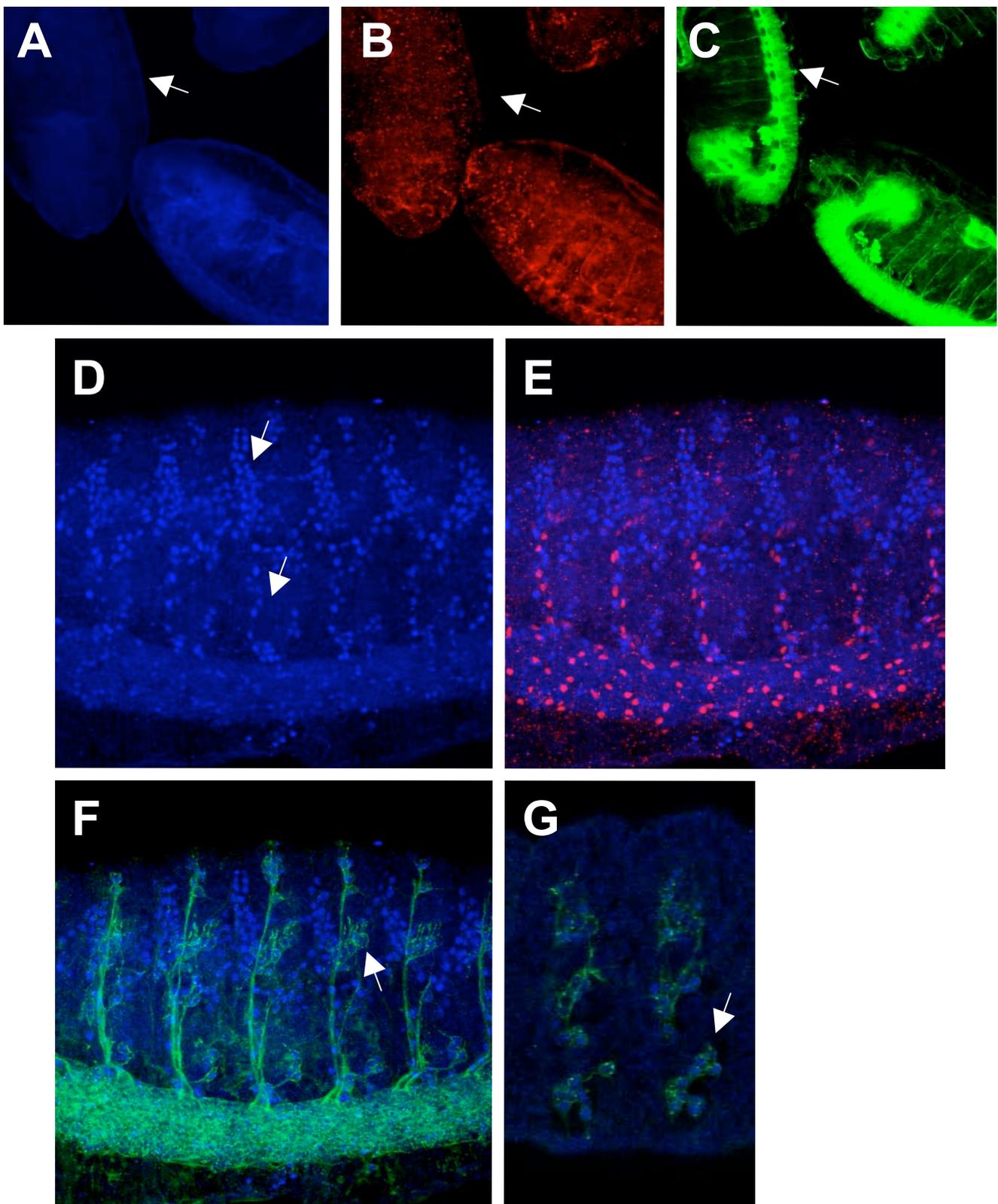
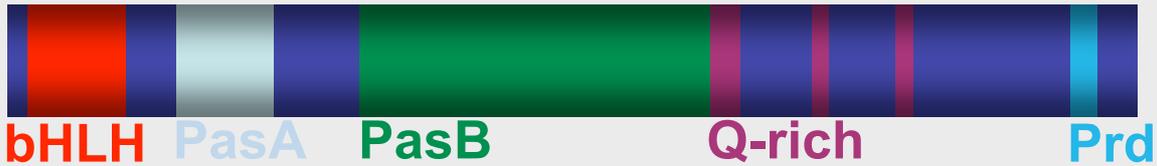


Abb.44: Konfokale Analyse der Tango Proteinexpression

A bis C *tango*^{A1-042} mutanter Embryo links, balancertragendes Kontrolltier rechts **D bis G** Wildtyp

whole mount Stadium 16 konfokale Färbungen. Das Expressionsmuster des anti-Tango Antikörpers ist in blau markiert. Die Neurone des Nervensystems sind über den anti-HRP Antikörper in grün dargestellt und die β -Galaktosidaseexpression des Balancertieres in **B** in rot. Gliazellen in **E** sind mittels des polyklonalen anti-Repo Antikörpers in rot dargestellt. *tango*^{A1-042} mutante Embryonen können anhand des ZNS Phänotyps und der nicht vorhandenen β -Galaktosidaseexpression identifiziert werden (Pfeile **A bis C**). In mutanten Embryonen ist keine Tango Expression nachweisbar (Pfeil **A**). Das Tango Protein ist cytoplasmatisch ubiquitär und nucleär vornehmlich in den Tracheen (Pfeile **D**) und sensorischen Organen des PNS (Pfeile **F und G**) lokalisiert. In den peripheren Gliazellen konnte keine nucleäre Colokalisation mit der Repoexpression nachgewiesen werden (**E**).

A Tango



(modifiziert nach Sonnenfeld et al. 1997)

B Mögliche Interaktionspartner:

	cytologische Lokalisation	
<i>cycle</i>	76C6	
<i>dCLOCK</i>	66A12	
<i>dysfusion/cranky</i>	96F12-14	<i>in situ</i> /RNAi Analyse
<i>gce</i>	13B6	RNAi Analyse
<i>RST(I)JH</i>	10D1	
<i>similar</i>	99D3-7	RNAi Analyse
<i>single minded</i>	87D11	
<i>spineless</i>	89B14-15	<i>in situ</i> /RNAi Analyse
<i>taiman</i>	30A2-6	<i>in situ</i> Analyse
<i>tango</i>	85C2	
<i>trachealess</i>	61C1	<i>in situ</i> Analyse

C

Genotyp	Letalität
A4 (<i>loco</i> GAL4)/UAS <i>tgo</i>	-
MZ97GAL4/UAS <i>tgo</i>	-
MZ97GAL4/UAS <i>tgo</i> DN	-
A4 (<i>loco</i> GAL4)/UAS <i>tgo</i> DN	L1-L2
A2 (<i>loco</i> GAL4)/UAS <i>tgo</i> DN	L1
D2 (<i>loco</i> GAL4)/UAS <i>tgo</i> DN	L1/L2/L3 Escaper
<i>repo</i> GAL4/UAS <i>tgo</i> DN	-
<i>btl</i> GAL4/UAS <i>tgo</i> DN	bis L1
<i>elav</i> GAL4/UAS <i>tgo</i> DN	-
<i>da</i> GAL4/UAS <i>tgo</i> DN	bis L1
<i>sl</i> GAL4/UAS <i>tgo</i> DN	-
24BGAL4/UAS <i>tgo</i> DN	pupal?

Abb.45: Tango Proteinstruktur, mögliche Interaktionspartner und Ergebnisse der Überexpressionsanalyse

A Tango Proteinstruktur

B mögliche Interaktionspartner

C Ergebnisse der Überexpressionsstudien

Tango in den Mittellinienzellen (nicht gezeigt), den Tracheen (Pfeil Abb.44D) und den sensorischen Gruppen des PNS (Pfeile Abb.44F und G) zu finden (Ward et al., 1998). Um herauszufinden, ob Tango auch in Gliazellen nucleär lokalisiert ist, wurde eine Doppelfärbung durchgeführt (anti-Repo aus Kaninchen, anti-Tango aus der Maus). Eine nucleäre Lokalisation von Tango in den peripheren Gliazellen konnte nicht beobachtet werden (Abb.44E).

3.9.6 Mögliche Interaktionspartner von Tango bei der Kontrolle der Migration peripherer Gliazellen

Für Tango wurde gezeigt, daß es mit anderen, spezifisch exprimierten bHLH-PAS Transkriptionsfaktoren heterodimerisiert, um seine unterschiedlichen Funktionen auszuüben (z.B. mit Single minded in der Mittellinienglia oder mit Tracheless in den Tracheen) (Crews and Fan, 1999). Anders als das Mammalia Homolog scheint Tango nicht homodimerisieren zu können (Sonnenfeld et al., 1997). Um einen möglichen Interaktionspartner und eine Funktion von Tango während der Migration der peripheren Gliazellen zu finden, wurde durch Datenbankrecherche eine Liste mit bHLH-PAS Proteinen aufgestellt (Abb.45B).

Zunächst wurde davon ausgegangen, daß die Tango Funktion in den peripheren Gliazellen für die Migration gebraucht wird, da die Expression des *tgo DN* Konstruktes via *loco* GAL4 einen Gliamigrationsphänotyp und frühlarvale Letalität induziert. Tango wird nicht nucleär in den peripheren Gliazellen exprimiert (Abb.44E). Also sollte der Interaktionspartner in diesem Kontext in den peripheren Gliazellen oder dem möglichen Substrat der Migration, den PNS Neuronen, exprimiert werden. Außerdem ist es wahrscheinlich, daß das betreffende Gen bei Funktionsverlust einen Defekt in der Migration der peripheren Gliazellen aufweist und gleich Mutationen im Gen *tango* embryonale Letalität verursacht.

3.9.6.1 mRNA bzw. Proteinexpression möglicher Interaktionspartner

Um die mRNA Expression der möglichen Interaktionspartner zu untersuchen, wurden aus genomischer DNA Exonfragmente der entsprechenden Gene von 0,7 bis 1,5 kb Länge in den PCR 2.1 Vektor subkloniert (Karten sind dem Anhang

beigefügt). Diese dienten als Template zur Erstellung von DIG markierten *antisense* Sonden der Gene: *cycle*, *RST(I)JH*, *sima*, *dysfusion/cranky*, *trachealess*, *spineless* und *taiman*. Die letzten vier der aufgezählten bHLH-PAS Domänen kodierenden Gene zeigten spezifische Signale, und die Expressionsprofile der mRNAs während der Embryogenese konnten beschrieben werden (Abb.46 bis 49). Die Analyse der übrigen drei Gene steht noch aus.

Das mRNA Expressionsmuster von *dysfusion*

Für Dysfusion (Dys) wurde gezeigt, daß es mit Tango heterodimerisiert und einen putativen, DNA bindenden Komplex bildet (Jiang and Crews, 2003). RNAi Experimente ergaben, daß Dys in den Tracheen in vielen Fusionsprozessen gebraucht wird (vgl. Abb.2). Während der Embryogenese wird *dysfusion* in vielen Gewebetypen exprimiert (Abb.46). Früheste Expression konnte in Zellen des Mesoderms und/oder Hinterdarms im Stadium 10 beobachtet werden (Pfeile Abb.46A und D). Ab Stadium 13 ist das Transkript in den Zellen der dorsalen *leading edge* (des dorsalen Schlusses) exprimiert (Pfeile Abb.46B und G). Außerdem exprimieren Tracheen, der dorsale Ast (Pfeil Abb.46C) und der laterale Ast (Pfeilkopf Abb.46B) sowie Zellen der Vorderdarmvorläufer (Pfeile Abb.46E und H), im Hinterdarm (Pfeilkopf Abb.46F) und in der Analplatte (Pfeil Abb.46F) das Transkript. Eine Expression im Nervensystem ist anterior im Nervensystem zu sehen (Pfeilkopf Abb.46H). Im PNS konnte eine spezifische Lokalisation der mRNA weder in neuronalen noch glialen Zellen detektiert werden.

Das mRNA Expressionsmuster von *trachealess*

Das Gen *trachealess* besitzt viele Funktionen während der Embryogenese. In *trachealess* mutanten Embryonen sind u.a. keine Tracheen vorhanden, die Vorläuferzellen scheinen nicht die Fähigkeit zu besitzen, Röhrensysteme zu formieren (Brody, 1999; Wilk et al., 1996). *trachealess* wird in den Tracheen- und Speicheldrüsenanlagen exprimiert (Pfeile Abb.47A und E). Eine Expression in den Tracheen beginnt Stadium 8 und verbleibt dort bis zum Ende der Embryogenese (Pfeile Abb.47C und J). Im Nervensystem exprimieren ab Stadium 12 Mittellinienzellen *trachealess* (Pfeil Abb.47G). Weitere Expression in einem Subset

von Zellen des Nervensystems (Pfeil Abb.47H) folgt, die auch in späten Stadien der Embryogenese zu beobachten ist (Abb.47L). In der lateralen Körperwand scheint die Expression jedoch auf die Tracheen beschränkt zu sein.

Das mRNA Expressionsmuster von *spineless*

Spineless ist das bHLH-PAS Protein, welches die höchste Homologie zum Aryl hydrocarbon receptor (auch: Ahr- oder Dioxinrezeptor) der Mammalia besitzt. Im Zusammenhang mit der Antennen- und Tarsenentwicklung bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß Tango und Spineless Heterodimere ähnlich wie Ahr:Arnt Heterodimere agieren können (Emmons et al., 1999). *spineless* mRNA kann im Stadium 9 erstmals in den Antennalanlagen detektiert werden (Pfeil Abb.48A und B). Neben den Antennalanlagen exprimieren ab Stadium 11 die Mandibular- (Md;schwach), Maxibular- (Mx) und Labialsegmente (Lb) (Pfeile Abb.48D). Das Transkript findet sich (ab diesem Stadium) auch in einem Subset lateraler Zellen. Diese sind in späteren Stadien als sensorische Zellen des PNS zu erkennen (Pfeilköpfe Abb.48 E,F und G). *spineless* mRNA ist also vergleichbar mit *tango* mRNA im PNS exprimiert. Eine Expression in den peripheren Gliazellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Das mRNA Expressionsmuster von *taiman*

taiman codiert einen Steroidhormon Coaktivator. Mutationen in *taiman* führen zu Defekten der Migration der sog. *border cells* (Bai et al., 2000; McDonald et al., 2003) (vgl. Abb.3). Eine maternale *taiman* mRNA Komponente kann nachgewiesen werden (Abb.49A). In späteren Stadien ist Expression im Bereich der Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms, der somatischen Muskulatur (Pfeile Abb.49 E und F) und in Zellen der Amnioserosa (Pfeil Abb.49D) zu finden. Ab Stadium 14 wird das Transkript nahezu ubiquitär exprimiert, auch in Zellen der Mittellinie (Pfeil Abb.49G) und in den Tracheen (Pfeil Abb.49I). Im ZNS sind ebenfalls erhöhte Level der *taiman* mRNA zu finden (Abb.49K).

Die Taiman Expression konnte zusätzlich durch die *lacZ* Expression einer Enhancer trap Insertion in *taiman* analysiert werden (Abb.50A bis C in rot). Anhand

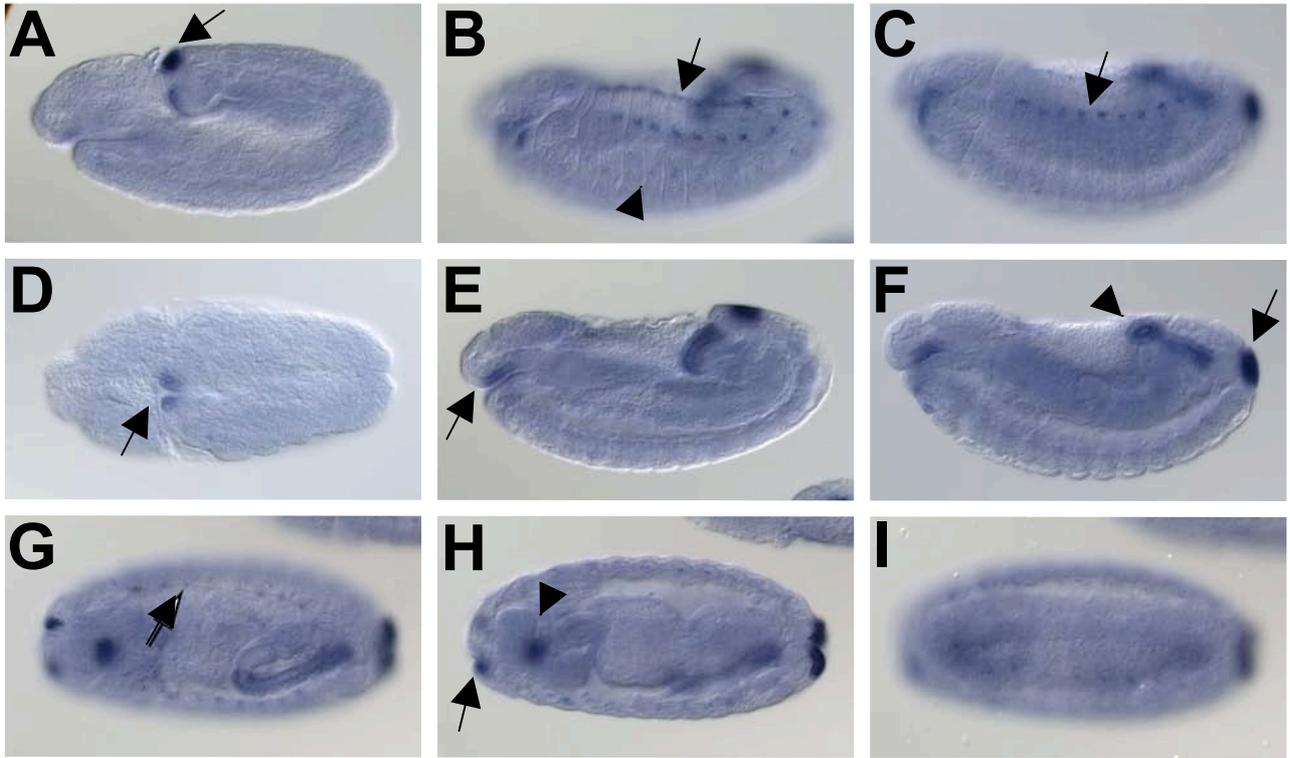


Abb.46: Das mRNA Expressionsmuster von *dysfusion/cranky*

A Stadium 10 lateral **B** Stadium 12 lateral **C** Stadium 14 lateral **D** Stadium 10 dorsal **E** vgl. B andere Fokusebene **F** vgl. C andere Fokusebene **G bis I** Stadium 14

Das dynamische mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *dysfusion/cranky* generiert. Anterior ist links. Zellen im Bereich der Hinterdarminvagination exprimieren das Transkript ab Stadium 10 (Pfeile **A** und **D**). Ab Stadium 12 exprimieren Zellen der dorsalen *leading edge* (Pfeile **B** und **G**), des dorsalen Tracheenastes (Pfeil **C**) und des lateralen Astes (Pfeilkopf **B**). Weiter sind Transkripte im Pharynx (Pfeil **E** und Pfeilkopf **H**), im Hinterdarm (Pfeilkopf **F**) und in den Analplatten (Pfeil **F**) zu detektieren. Expression ist auch im Antennomaxillarorgan zu finden (Pfeilkopf **H**).

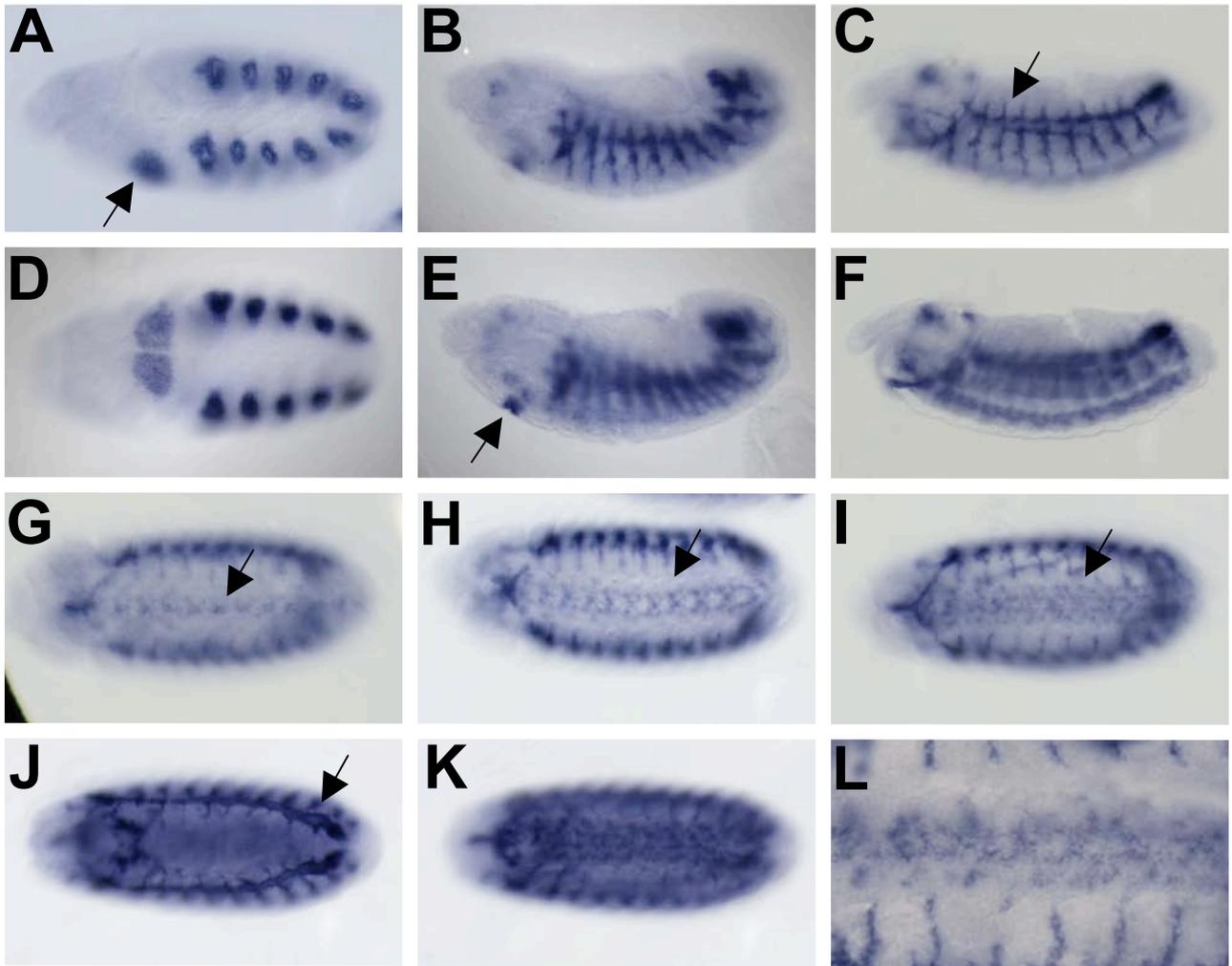


Abb.47: Das mRNA Expressionsmuster von *trachealess*

A Stadium 8 lateral **B** Stadium 12 lateral **C** Stadium 14 lateral **D** Stadium 10 dorsal **E** vgl. B andere Fokusebene **F** vgl. C andere Fokusebene **G** Stadium 12 ventral **H** Stadium 14 ventral **I** Stadium 15 ventral **J** Stadium 16 dorsal **K** Stadium 16 ventral **L** Detailansicht aus I

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *trachealess* generiert. Anterior ist links. *trachealess* Transkripte sind in den Speicheldrüsenanlagen ab Stadium 8 bis zum Stadium 12 zu erkennen (Pfeile **A** und **E**). Expression in trachealen Zellen beginnt Stadium 8 und dauert durch die gesamte Embryogenese an (exemplarisch: Pfeile **C** und **J**). Mittellinienzellen exprimieren ab Stadium 12 (Pfeil **G**) *trachealess*; zusätzliche Expression in einem Subset von Zellen des Nervensystems (Pfeil **H**) ist wenig später auch bis zum Ende der Embryogenese zu beobachten (Pfeil **I**, detaillierter in **L**).

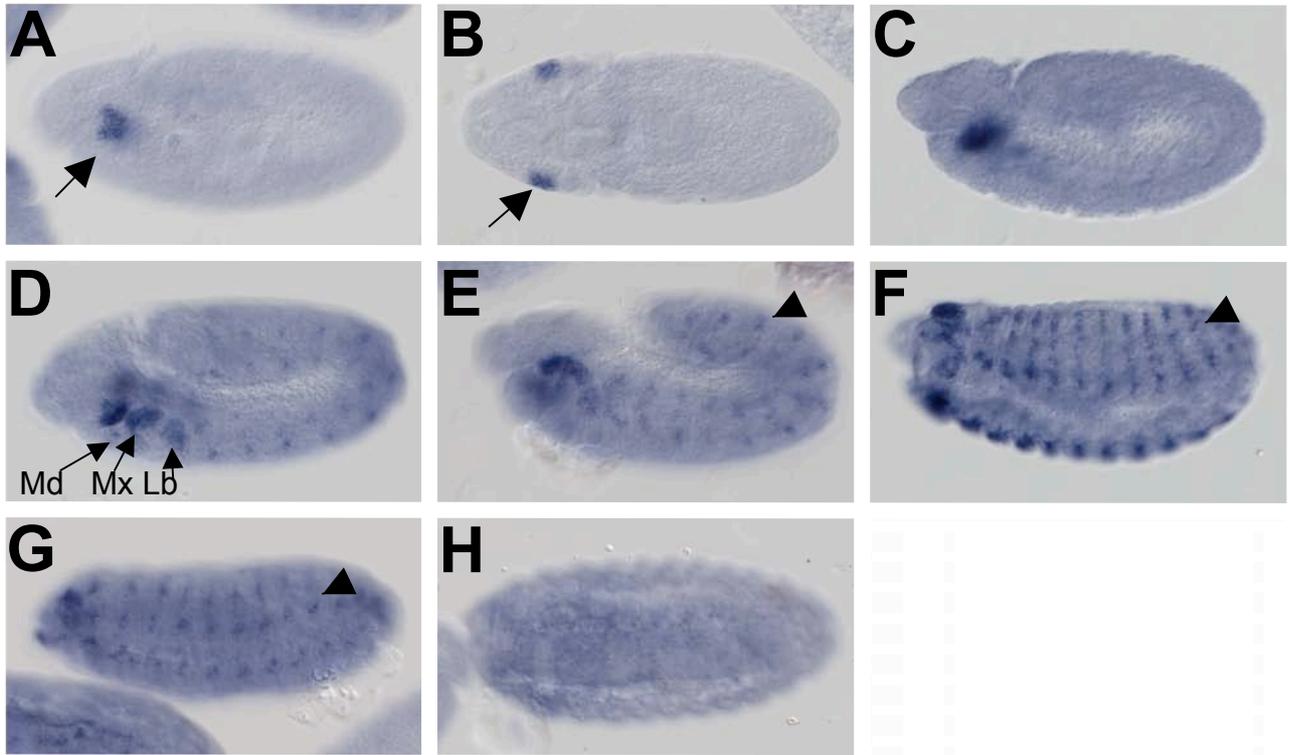


Abb.48: Das mRNA Expressionsmuster von *spineless*

A Stadium 10 lateral **B** Stadium 10 dorsal **C** Stadium 11 lateral **D** Stadium 11-12 lateral **E** Stadium 12 lateral **F** Stadium 14 ventro-lateral **G** Stadium 15 lateral **H** Stadium 16 ventral

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *spineless* generiert. Anterior ist links. Im Stadium 9 kann *spineless* erstmals in den Antennalanlagen detektiert werden (Pfeil **A** und **B**). Neben den Antennalanlagen exprimieren ab Stadium 11 die Mandibular- (Md;schwach), Maxibular- (Mx) und Labialsegmente (Lb) (Pfeile **D**). Das Transkript findet sich (ab diesem Stadium) auch in einem segmentalen Muster (Pfeilköpfe **E**, **F** und **G**).

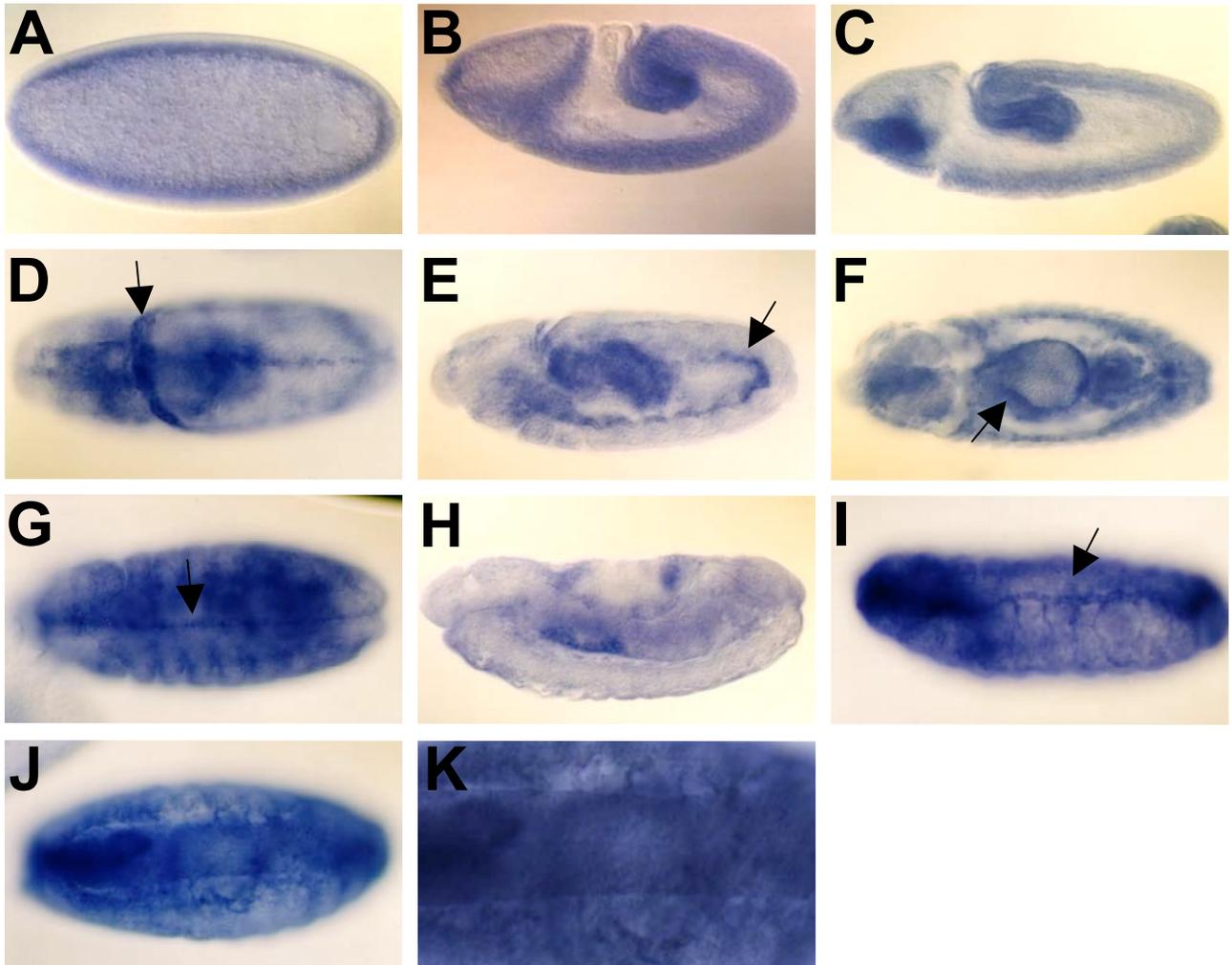


Abb.49: Das mRNA Expressionsmuster von *taiman*

A Zelluläres Blastoderm **B** Stadium 8 lateral **C** Stadium 10 lateral **D** Stadium 11 dorsal **E** Stadium 11 lateral **F** Stadium 12 dorsal **G** Stadium 14 ventral **H** Stadium 14 lateral **I** Stadium 15 lateral **J** Stadium 16 ventral **K** Detailausschnitt aus J

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch *whole mount in situ* Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *taiman* generiert. Anterior ist links. Maternale *taiman* mRNA ist in den ersten Stadien zu sehen (**A**). In den folgenden Entwicklungsstadien ist Expression im Bereich der Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms, der somatischen Muskulatur (Pfeile **E** und **F**) und in Zellen der Amnioserosa (Pfeil **D**) zu finden (**B** bis **F**). Ab Stadium 14 wird das Transkript fast ubiquitär exprimiert, auch in Zellen der Mittellinie (Pfeil **G**) und in den Tracheen (Pfeil **I**). Es gibt es eine verstärkte ZNS Expression (**J** und **K**).

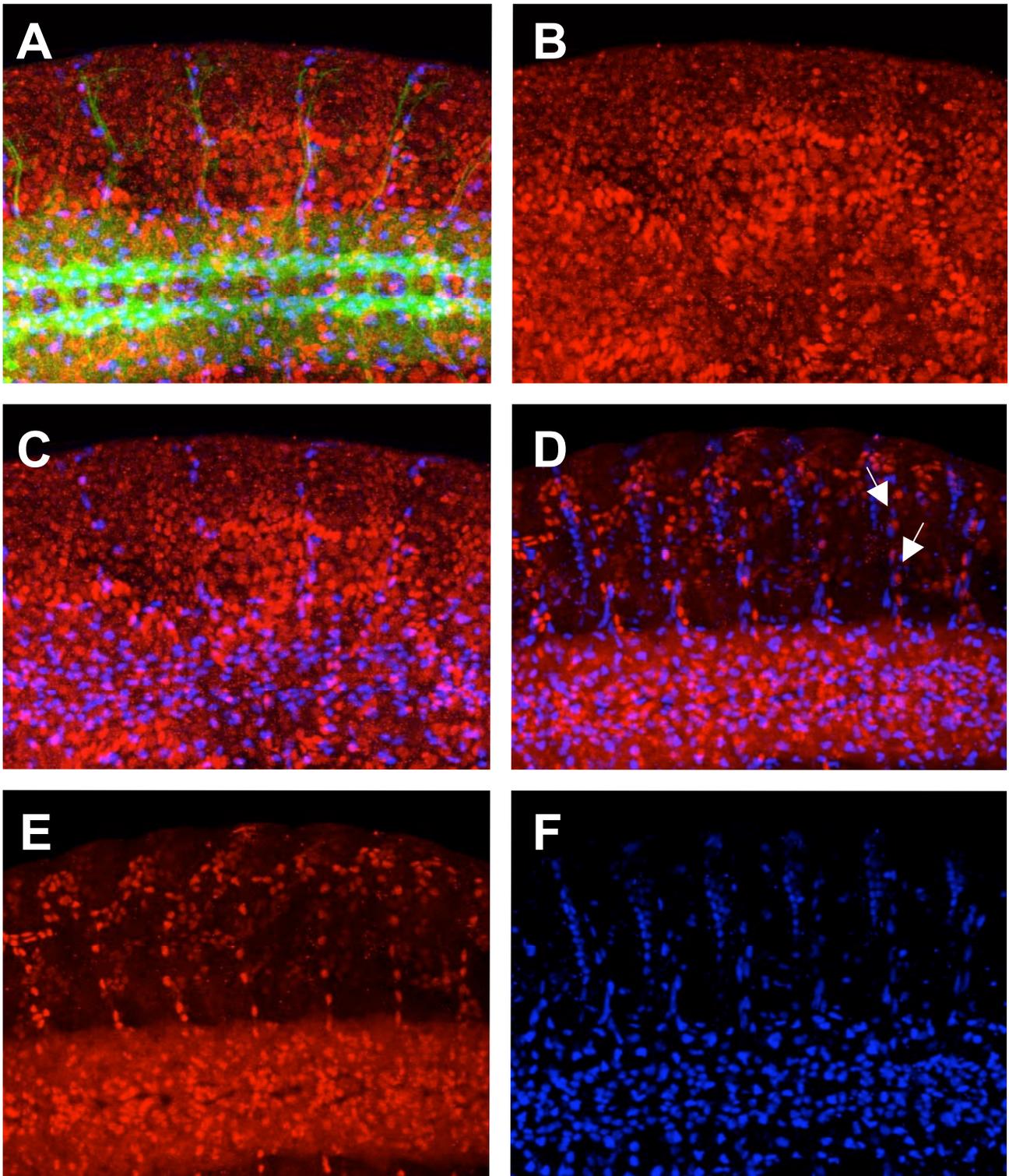


Abb.50: Analyse der Taiman- und Tangoexpression in Gliazellen

A bis C *taiman* Enhancer trap Insertion **D bis F** *glial cells missing* Enhancer trap Insertion

whole mount Stadium 16 konfokale Färbungen; anterior ist links, das ZNS ist nach unten ausgerichtet. In **A bis C** ist die β -Galaktosidaseexpression der *taiman* Enhancer trap Insertion in rot dargestellt. Der anti-HRP Antikörper markiert die Neurone des Nervensystems in grün. In blau dargestellt sind die Repo positiven Gliazellen. In **D bis F** ist die Tangoexpression in rot und die Gliazellen sind über die β -Galaktosidaseexpression der *glial cells missing* Enhancer trap Insertion in blau markiert. Weder Taiman noch Tango werden nucleär in peripheren Gliazellen exprimiert. Nuclei der Tracheenzellen und der peripheren Gliazellen sind unmittelbar benachbart (Pfeile **D**).

der Überlagerung dieser Expression mit der Repoexpression (Abb.50C) wird deutlich, daß es in den peripheren Gliazellen keine Colokalisation beider Signale gibt. Dieses Experiment zeigt, daß die Tracheen und peripheren Gliazellen in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Tangoexpression mit der *lacZ* Expression der Enhancer trap Insertion *rA87* (eine Insertion in das Gen *glial cells missing*) verglichen (Abb.50D bis F). In Abb.50D ist die Projektion dieser beiden Überlagerungen zu sehen (Gcm Expression in blau, Tangoexpression in rot). Periphere Gliazellen und Tracheenzellen sind direkt nebeneinander lokalisiert (Abb.50 Pfeile D).

3.9.6.2 Erstellung von RNAi Konstrukten zur Identifizierung eines Interaktionspartners von Tango

Um untersuchen zu können, ob die Gene, die mit *tango* interagieren könnten, bei Verlust auch Defekte in der Migration der peripheren Gliazellen zeigen, wurden - in Ermangelung von definierten Mutationen - RNAi Konstrukte erstellt. Die Klonierungsstrategie und der verwendete Vektor sind in Abb.50 dargestellt. Karten sind dem Anhang beigelegt. Seit ein paar Jahren ist bekannt, daß durch die RNAi (*RNA interference*) Methode spezifisch Gene inaktiviert werden können (Fire et al., 1998; Kennerdell and Carthew, 1998; Kennerdell and Carthew, 2000). Dies ist im Vergleich zur Generierung von EMS Mutationen eines spezifischen Gens eine wesentlich einfachere Methode, um Funktionsverluste und ihre phänotypischen Auswirkungen untersuchen zu können. Weiter vereinfacht wurde diese Methode durch das zellspezifische Ausschalten von Genen mittels des UAS/GAL4 Systems. Die Vektoren, die dazu benutzt werden, setzen ein Intron als „Spacer“ zwischen die gegenläufig ausgerichteten Sequenzen (Abb.50). Nach Expression dieses Konstruktes kommt es zu „loopless hairpin“ Doppelstrang RNA Produkten, die durch „RNA interference“ die Zerstörung der endogenen mRNA induzieren (Lee and Carthew, 2003).

Es wurden RNAi Konstrukte der Gene *dysfusion/cranky*, *germ cell-expressed bHLH-PAS*, *spineless* und *similar* erstellt, injiziert und transgene Stämme etabliert. Erste Analysen dieser Konstrukte ergaben, daß mit den Aktivatorlinien *loco* GAL4, *daughterless* GAL4 und *breathless* GAL4 es zu frühlarvaler Letalität in Kombination

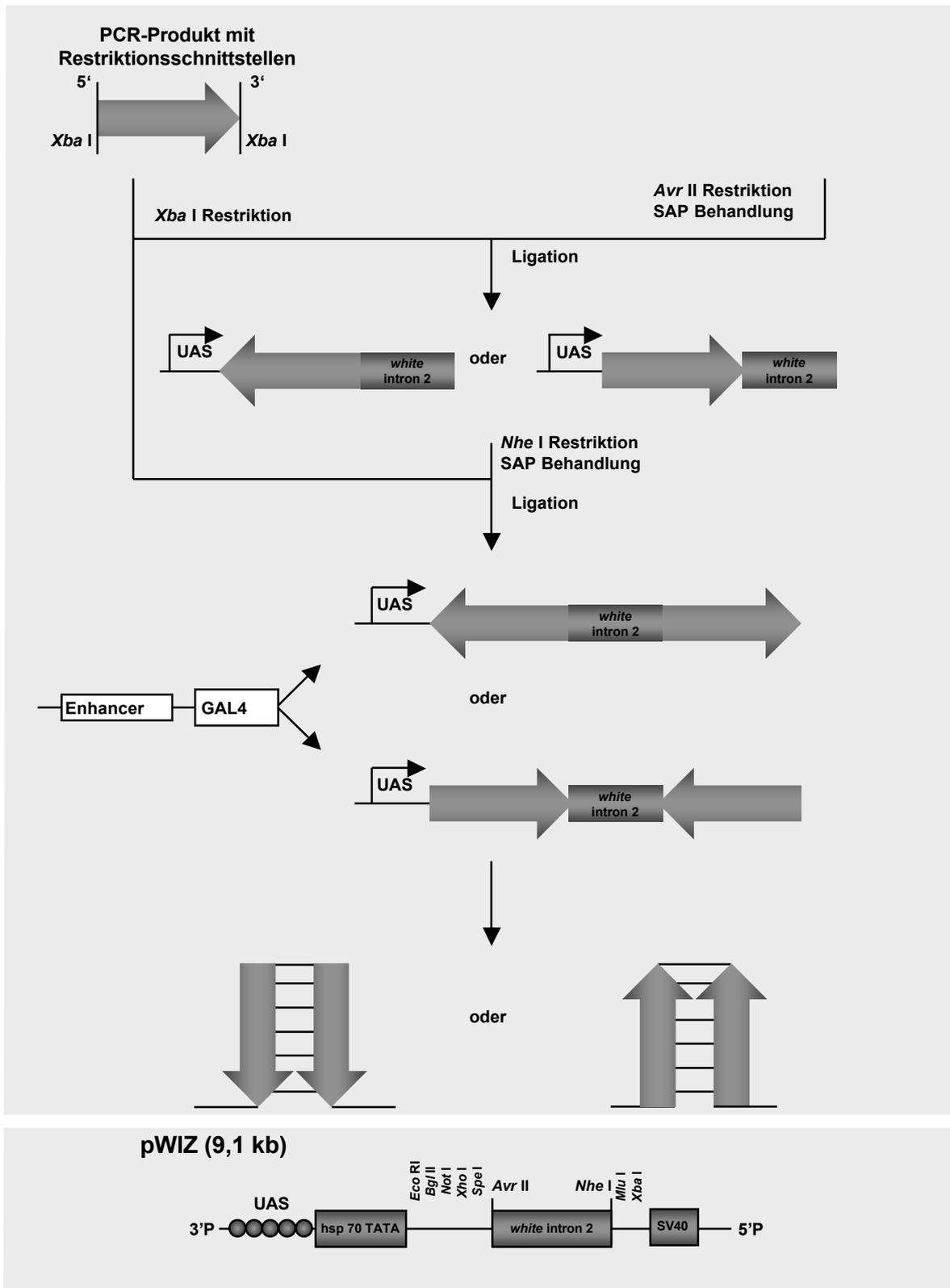


Abb.51: Klonierungsstrategie von UAS-RNAi Konstrukten

Ausgewählte PCR-Produkte - generiert mit Restriktionsstellen durch *mismatch* Primer - wurden in den Vektor zu beiden Seiten des *white* Introns 2 gegensätzlich orientiert eingebracht. Das erhaltene Konstrukt kann via GAL4 System zellspezifisch exprimiert werden. In der Zelle wird die prä-mRNA gespleißt und es resultieren sequenzspezifische Doppelstrang RNA Fragmente (Schema modifiziert nach Lee et al. 2002).

mit dem *germ cell-expressed bHLH-PAS* RNAi Konstrukt kommt. Bis auf die Expression in den Keimzellen ist für das Gen *germ cell-expressed bHLH-PAS (gce)* nichts bekannt (Moore et al., 2000). In *loco* GAL4/*gce* RNAi Embryonen konnte keine unregelmäßige Lokalisation der peripheren Gliazellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die *dysfusion/cranky* und *similar* RNAi Konstrukte zeigten keine Letalitäten und das *spineless* RNAi Konstrukt konnte noch nicht analysiert werden.

3.10 Analyse des Gens *crooked neck*

3.10.1 *crooked neck* kontrolliert die Migration der peripheren Gliazellen

Aus dem Screen gingen mehrere Mutanten hervor, die eine ektopische Expression der *J29* Enhancer trap Insertion in Bereichen des Darms und Gliazellmigrationsphänotypen aufwiesen. Beispiele hierfür sind in Abb.28A und B dargestellt. Die Mutante *IX-15H6* wies einen sehr penetranten Phänotyp der Gliazellmigration auf. Der betreffende Locus wurde kartiert und die anfänglich *pilage^{IX-15H6}* genannte Mutante konnte als Allel des bereits publizierten *crooked neck (crn)* Gens identifiziert werden (Kartierungsdaten vgl. nächsten Abschnitt). Durch erneuten phänotypischen Abgleich dieser Mutation und mittels Komplementationskreuzungen konnten zwei weitere Allele in die Komplementationsgruppe eingeordnet werden: *crn^{III-26H8}* und *crn^{V-8H7}*. Die *crn^{IX-15H6}* und *crn^{III-26H8}* Chromosomen können durch die Duplikation *Dp(1;2;Y)w⁺* gerettet werden (siehe nächster Abschnitt) und tragen somit keinen weiteren letalen Treffer auf dem X-Chromosom.

In *crn^{IX-15H6}* mutanten Embryonen sind die peripheren Gliazellen in normaler Anzahl entlang der axonalen Trakte des PNS zu finden (Abb.52). Dies wurde nicht nur anhand der *J29* Insertion (Abb.52B), sondern auch mittels des anti-Repo Antikörpers determiniert. Der anti-Repo Antikörper markiert alle Gliazellkerne des Embryos mit Ausnahme der Mittelliniengliazellen (Abb.52E). In *crooked neck* mutanten Embryonen finden sich wildtypische Anzahlen der sog. unterstützenden Zellen und der im PNS geborenen dorsolateralen Gliazelle, die ebenfalls durch den anti-Repo Antikörper markiert werden (Abb.52F). Frühe Differenzierungsprozesse

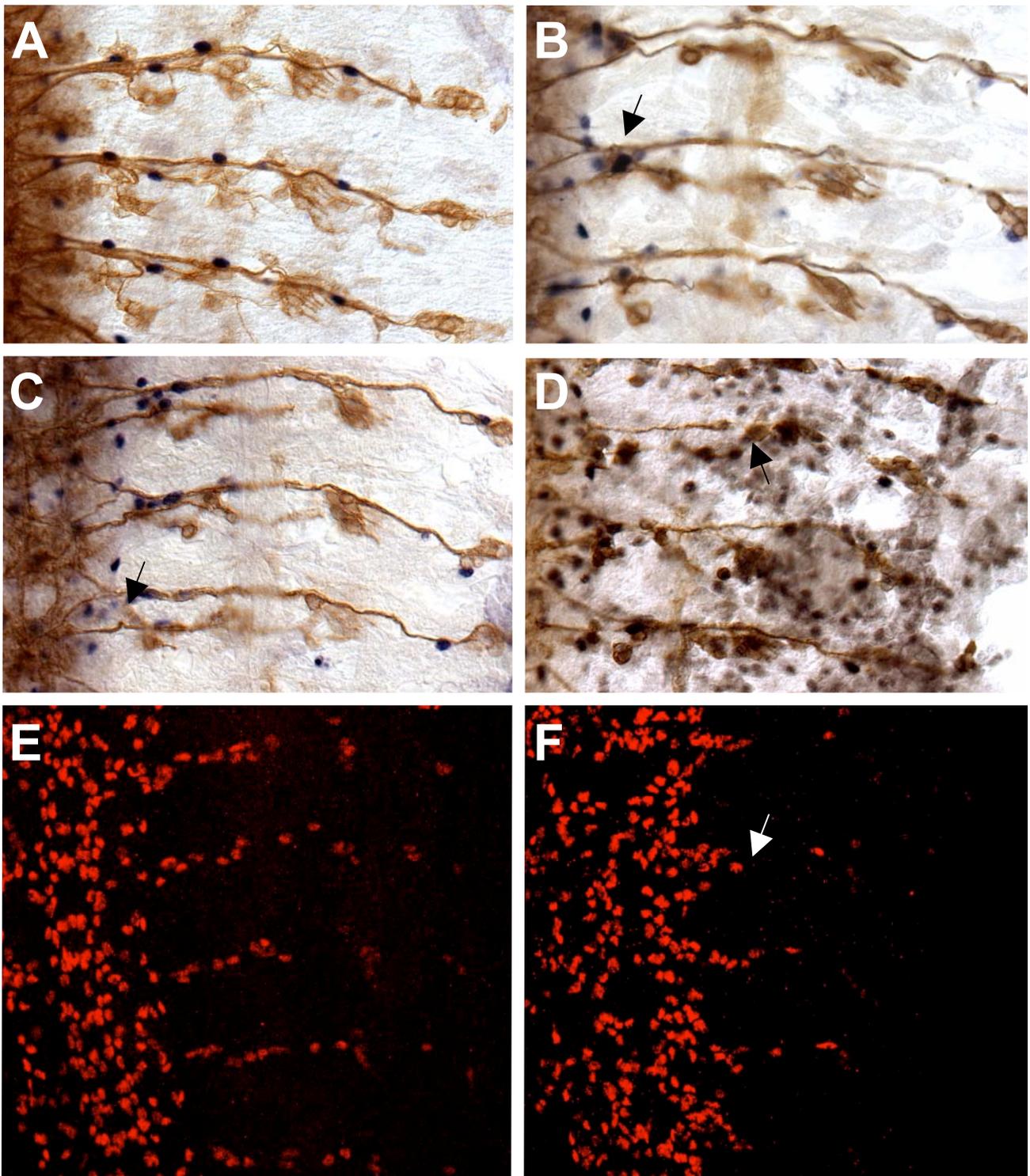


Abb.52: Migrationsphänotyp der peripheren Gliazellen und axonale Defekte in *crooked neck* Mutanten

A Wildtyp PNS Präparation **B und C** *crn*^{IX-15H6} PNS Präparation **D** *crn*^{III-26H5} PNS Präparation **E** Wildtyp *whole mount* konfokale Färbung **F** *crn*^{IX-15H6} *whole mount* konfokale Färbung

Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde in **A** bis **D** mit mAb anti-Futsch, Gliazellen mittels der J29 Expression markiert. Konfokale Analyse der Gliamigration erfolgte in **E** und **F** mittels des anti-Repo Antikörpers in rot. In *crooked neck* mutanten Embryonen erfolgt eine starke Reduktion der Migration. Oft verbleiben die Glianuclei in Nähe ihres Entstehungsortes (Pfeile **B** und **F**). Das axonale Muster ist ebenfalls gestört. ISN und SN verlaufen oft parallel (Pfeil **C**), in *crn*^{III-26H8} mutanten Embryonen sind die axonalen Projektionen stark reduziert (Pfeil **D**).

scheinen daher nicht durch die Mutation betroffen zu sein.

Die Migration der peripheren Gliazellen ist in *crn* Mutanten extrem reduziert. Es ist zu erkennen, daß die Gliazellen sehr nahe an ihrem Entstehungsort verbleiben und – wenn überhaupt - nur kurze Migrationsstrecken zurücklegen. Dies betrifft sowohl die ventrolaterale periphere Gliazelle als auch die, die entlang des Intersegmentalnervs migrieren. Oft befinden sich in mutanten Stadium 16 Embryonen die peripheren Gliazellen in einer „kegelförmigen“ Gruppierung (Pfeil Abb.52F). Diese tritt im Wildtyp im Stadium 13 auf, unmittelbar vor Beginn der Migration. In diesen mutanten Bereichen scheint keine Migration stattzufinden. Nicht alle peripheren Gliazellen verbleiben uniform an vergleichbaren Positionen mit den Axontrakten assoziiert, sondern finden sich teilweise zwischen dem Segmental- und Intersegmentalnerv (Pfeil Abb.52C). Zudem treten in den Ablagen schwächere Phänotypen auf, in denen die Gliazellen eine kurze Distanz hauptsächlich entlang des Intersegmentalnervs zurücklegen. Diese Fehlmigration findet sich in allen *crn* Allelen in gleich starker Ausprägung obwohl die neuronalen Defekte des *crn^{III-26H8}* mutanten Phänotyps wesentlich stärker sind als die in *crn^{IX-15H6}* mutanten Tieren. Durch anti-Repo Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der peripheren Gliazellen in *crn^{III-26H8}* mutanten Embryonen in einigen Segmenten um ein bis zwei Zellen reduziert ist (Abb.70C). Die Anzahl der *J29* positiven Gliazellen ist wildtypisch (Abb.52D). Auffällig ist eine ektopische Expression der *J29* Expression in epidermalen Zellen und in den Tracheen (Abb.52D).

3.10.2 Das Gen *crooked neck*

3.10.2.1 Kartierung der *crooked neck* Mutation

Die cytologische Kartierung des *crn^{IX-15H6}* Allels erfolgte mittels des im Bloomington Stock Center erhältlichen Duplikationskit für das X-Chromosom. Duplikationstragende Männchen wurden gegen jungfräuliche Weibchen des *crn^{IX-15H6}* Stammes gekreuzt. Die Nachkommen dieser Generation wurden auf eine Rettung der Letalität in Männchen gesichtet. Da die Letalität über die Duplikation *Dp(1;2;Y)w⁺/C(1)DX,y¹w¹f¹* in Männchen gerettet werden konnte, wurde der Locus in den cytologischen Bereich 2D2 bis 2D3 kartiert. Die Duplikation *Dp(1;3)wvco*

(duplizierter Bereich 2B17-C1;3C5), die auch die Letalität rettet, schränkt den Genort weiter auf den cytologischen Bereich 2D2 bis 3C5 ein. Durch die Defizienzchromosomen *Df(1)64c18* (Bruchpunkte 2E1; 3C2) und *Df(1)Pgd-kz2* (Bruchpunkte D3-4;2F5) konnte die Letalität insgesamt in den cytologischen Bereich 2E1-2F5 kartiert werden. Die etwa 30 in Bloomington erhältlichen P-Element-Insertionslinien, Mutationen oder anderen chromosomalen Aberrationen, die in diesen Bereich kartieren, wurden gegen den *crn*^{IX-15H6} Stamm gekreuzt. *crn*^{yok-EH352} (Eberl and Hilliker, 1988) komplementierte die bis dato „pilage“ genannte *pil*^{IX-15H6} Mutation nicht. Für weitere Kartierungen, die u.a. zur Identifizierung des zweiten Allels *crn*^{III-26H8} führten, wurde ein Compound X tragender Stamm mit dieser Mutation etabliert, der die über die Y-chromosomale Duplikation geretteten Männchen stabil hält.

Daß die hier isolierten Allele das Gen *crooked neck* betreffen, ist durch mehrere Argumente belegt. Zum einen ähnelt der neuronale Phänotyp *crooked neck* mutanter Embryonen den neuronalen Defekten, die in der *crn*^{IX-15H6} Mutante auftreten (Zhang et al., 1991). Die in einem unabhängigen Screen gefundene EMS-induzierte Mutation *y*¹*crn*^{yok-EH352} zeigt die beschriebenen Gliamigrationsdefekte (Daten nicht gezeigt). Der Phänotyp wurde zudem in Transheterozygose der beiden Chromosomen *Df(1)64c18* und *crn*^{IX-15H6} leicht verstärkt.

3.10.2.2 Genstruktur und Sequenzanalyse der Allele *crn*^{III-26H8} und *crn*^{IX-15H6}

Das *Drosophila crooked neck* Gen umfaßt eine genomische Region von ca. 2,3kb (Zhang et al., 1991) und besteht aus zwei Exons und einem Intron. Das 1.Exon hat eine Länge von 36 Basepaaren (bp), das Intron ist 58 bp lang und das 2.Exon 2,073 kb (Abb.53A). Die cDNA hat eine Gesamtlänge von etwa 2.2kb. Sie codiert für ein Protein bestehend aus 16 variierenden Kopien des *tetratricopeptide repeats* (TPR). TPRs umfassen 34 Aminosäuren (aa) und sind innerhalb einer einzigen Polypeptidkette tandemartig wiederholt. Sequenzvergleiche ergaben acht konservierte Positionen innerhalb der 34 aa, die alle auf der gleichen Seite putativer amphipathischer α -Helices positioniert sind. Laut Modell können TPRs miteinander interagieren und intra- oder intermolekulare Verbindungen eingehen (Zhang et al., 1991).

A *crooked neck*
2,167 kb: 1.Exon 36 bp, Intron 58 bp, 2.Exon 2,073 kb

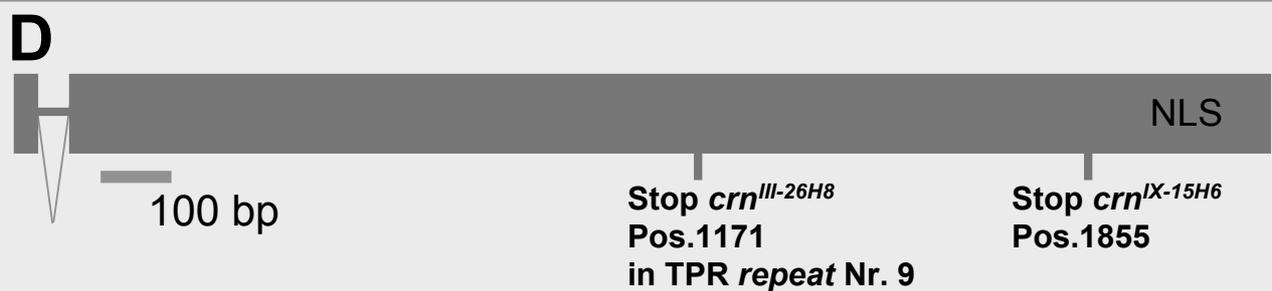
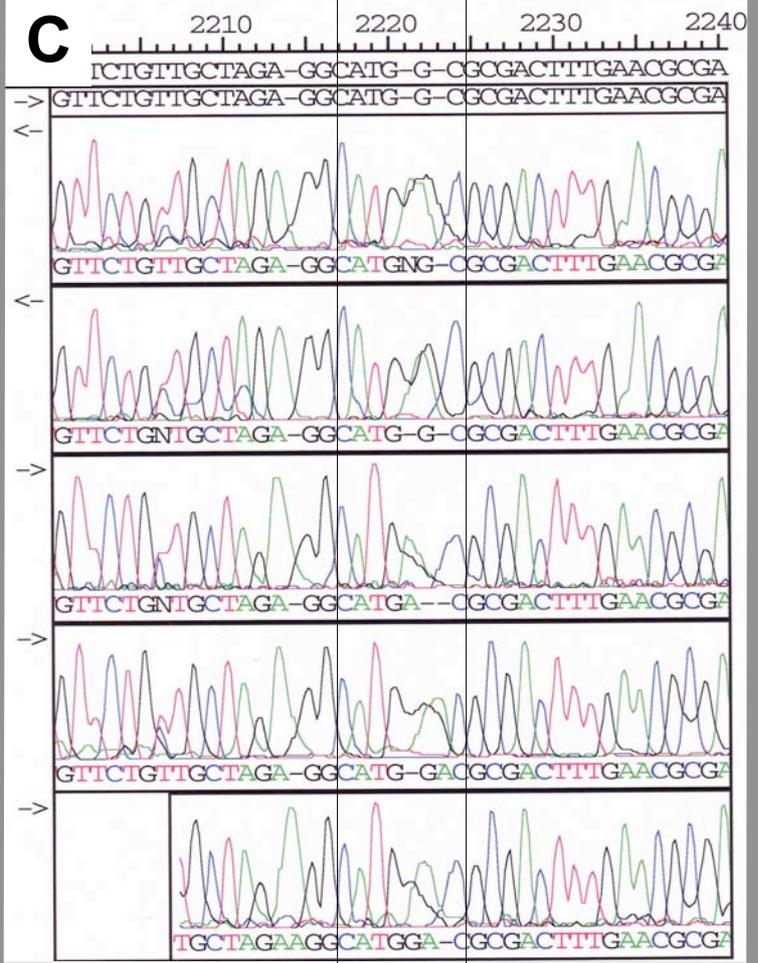
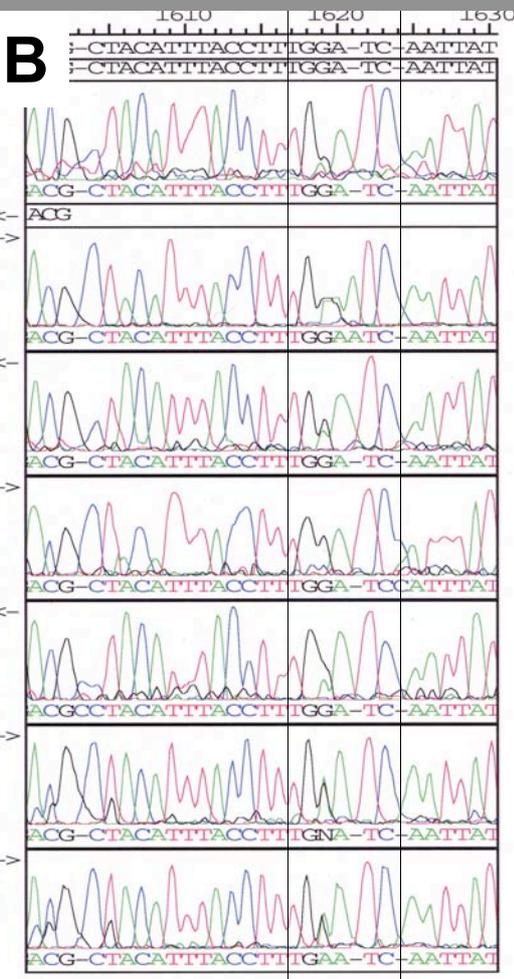
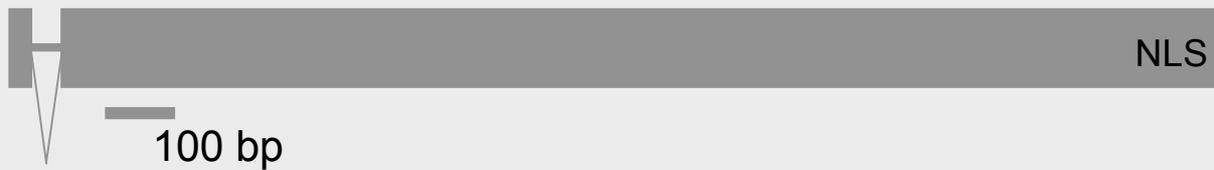


Abb.53: Struktur des Gens *crooked neck* und Sequenzanalyse zweier *crn* Mutationen

A *crooked neck* Genstruktur (NLS nucleäres Lokalisationssignal)
B *crn*^{IX-15H6} Sequenzanalyse **C** *crn*^{III-26H8} Sequenzanalyse
 Dargestellt sind in **B** und **C** die Sequenzvergleiche; die oberste Sequenz entspricht der BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*) Sequenz. Die schwarzen Linien deuten auf den Bereich des Basenaustausches innerhalb der einzelnen Sequenzen.
D Lokalisation der identifizierten Stop Codons

Aus den beiden Stämmen *crn*^{III-26H8} und *crn*^{IX-15H6} wurde zur Sequenzanalyse genomische DNA gewonnen. Diese diente als Template, um die genomische *crn* Region zu amplifizieren (Primer siehe Anhang). Die gewonnenen Amplifikate wurden sequenziert (Abb.53B und C). Das schwächere *crn*^{IX-15H6} Allel weist eine Basenänderung an Position 1855, die in einem Stop Codon resultiert, auf. Diese Stelle befindet sich hinter dem letzten TPR Motiv und direkt vor dem nucleären Lokalisationssignal (Abb.53D rechts). Das stärkere *crn*^{III-26H8} Allel weist einen Basenaustausch an Position 1171 auf, der in einem Stop Codon im Bereich des neunten TPR Motivs resultiert.

3.10.3 Analyse der *crooked neck* Expression

3.10.3.1 Analyse der mRNA-Expression

Das Expressionsmuster von *crooked neck* wurde bislang noch nicht dokumentiert. In dieser Arbeit wurde durch Hybridisierung einer DIG markierten RNA Sonde an *whole mount* Embryonen und Imaginalscheiben von Larven des dritten Larvalstadiums das Expressionsmuster untersucht (Abb.54). In frühen Embryonalstadien ist deutlich eine maternale Komponente zu erkennen (Abb.54A). Während der Mesoderminvagination exprimieren die Zellen des Mesoderms, die Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms und die der Kopffalte (Pfeil Abb.54B) *crn* mRNA. Ab der Gastrulation ist das Transkript ubiquitär lokalisiert. Dies ist bis zu Ende der Embryogenese zu beobachten. Besonders stark exprimierende Bereiche sind der Keimstreif (Pfeil Abb.54C) und im Stadium 15 das viscerale Mesoderm (Pfeil Abb.54F). Die *crn* Expression in larvalen Stadien wurde anhand von *in situ* Experimenten an Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums durchgeführt. Es zeigt sich eine ebenfalls ubiquitäre Lokalisation des Transkripts. In Abb.54H und I sind exemplarisch zwei solcher Imaginalscheiben dargestellt.

3.10.3.2 Lokalisation und ektopische Expression des Crn Proteins

Die durch Raisin-Tani und Léopold (Raisin-Tani and Leopold, 2002) generierten polyklonale Antikörper gegen Crooked neck erkennen im Western Blot

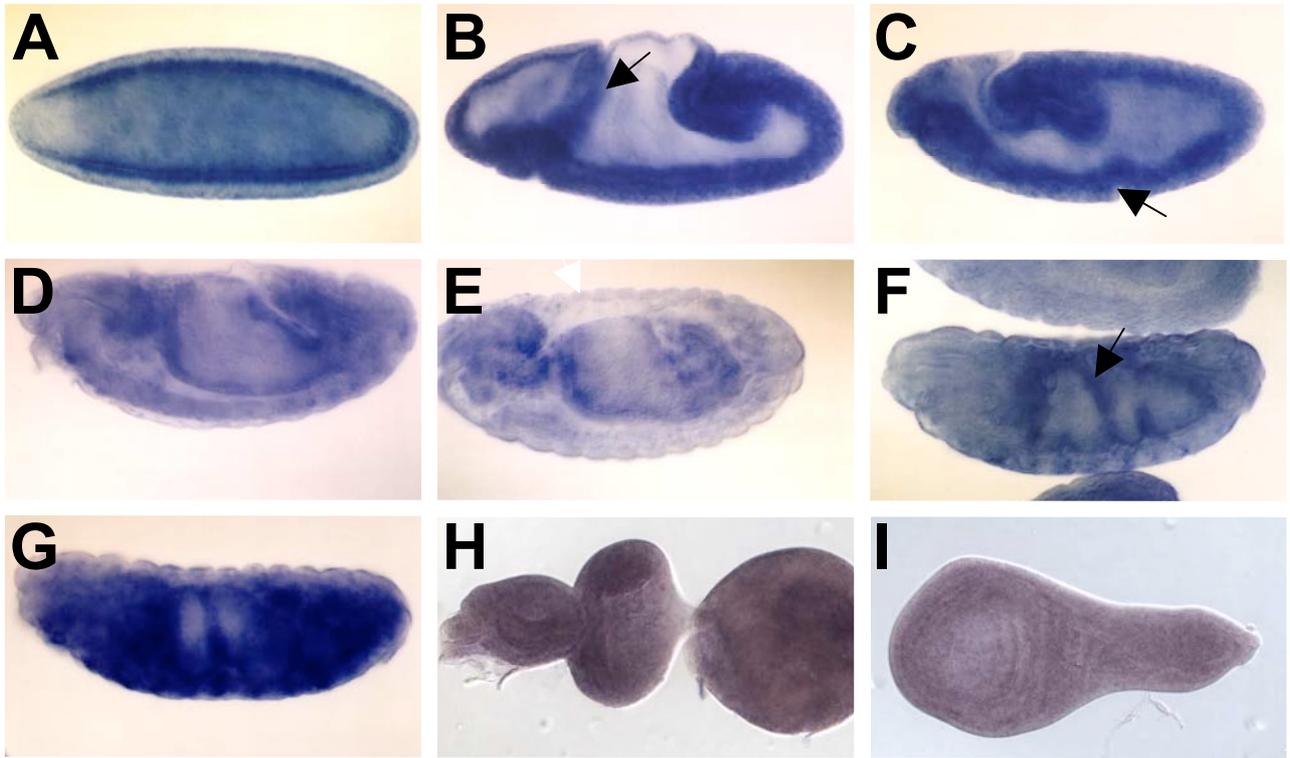


Abb.54 Das mRNA Expressionsmuster von *crooked neck*

A Zelluläres Blastoderm **B** Stadium 7 **C** Stadium 11 **D** Stadium 14 **E** Stadium 15 **F** Stadium 16 **G** Stadium 16-17 **H** Augenimaginalscheibe mit optischem Lobus **I** Flügelimaginalscheibe

Das mRNA Expressionsmuster wurde durch Hybridisierung mit einer transkriptspezifischen DIG-markierten *antisense* Sonde von *crooked neck* generiert. Die Expression wurde an *whole mount* Embryonen bestimmt; anterior ist links. Maternale *crooked neck* mRNA ist in frühen Stadien zu sehen (**A**). Während der Mesoderminvagination exprimieren mesodermale Zellen sowie die Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms *crooked neck* mRNA (Pfeil **B**). Die Expression ist ab der Gastrulation ubiquitär lokalisiert, was bis zum Ende der Embryogenese zu beobachten ist. Besonders stark ist Expression im Keimstreif (Pfeil **C**) und im visceralen Mesoderm zu beobachten (Pfeil **F**). In den Imaginalscheiben gibt es im dritten Larvalstadium generell eine ubiquitäre *cm* Expression; exemplarisch sind zwei davon dargestellt (**H** und **I**).

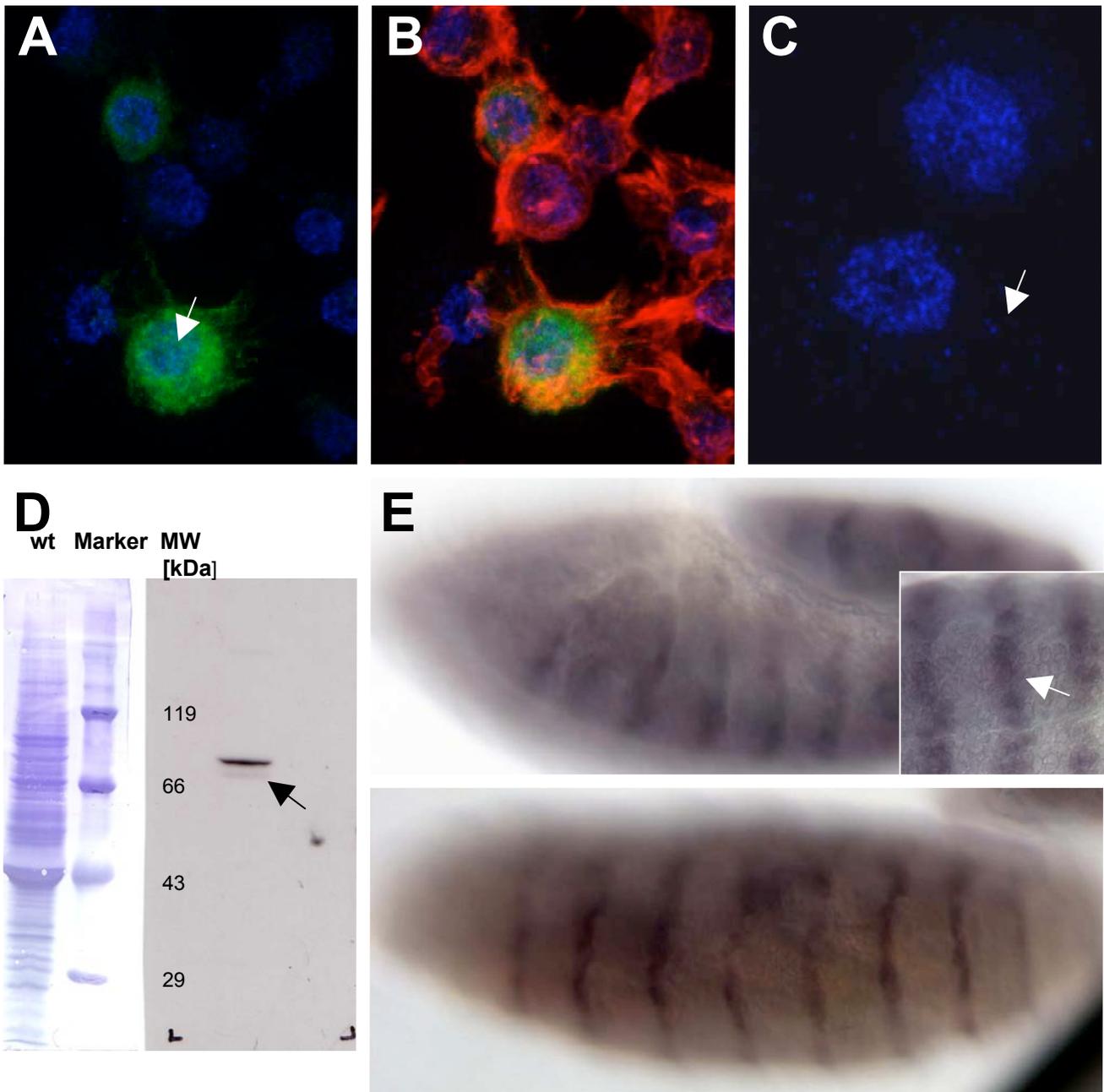


Abb.55: Crooked neck Proteinexpression

A, B und C Konfokale Analyse der Crn Proteinexpression in S2 Zellen **D** Western Blot Analyse des anti-Crooked neck Antikörpers **E** *cm* Überexpression mittels *engrailed*GAL4/UAS*crn*. anti-Crooked neck Färbung an *whole mount* Embryonen; anterior ist links, ventral unten.

Konfokale Analyse der Expression in S2 Zellen (anti-Crooked neck in blau, anti-GFP in grün, Visualisierung des Zytoskeletts über Phalloidin in rot). Crn Expression ist überwiegend im Kern zu finden (Pfeil **A**). Geringe Anteile befinden sich außerhalb des Kerns, wie in der Vergrößerung in **C** zu sehen ist (Pfeil **C**). Der aufgereinigte anti-Crn Antikörper detektiert im Western Blot eine 88 kDa Bande zusammen mit einer schwachen, zweiten Bande (Pfeil **D** vgl. Literaturwerte). Nach Überexpression detektiert der anti-Crn Antikörper das ektopische Protein sowohl im Nucleus als auch im Cytoplasma der Zellen (Pfeil Ausschnittsvergrößerung in **E**) in frühen als auch späten Stadien der Embryogenese.

eine Bande von 88kDa, die anhand der Co-Migration des *in vitro* translatierten Produktes einer *crn*-cDNA als das Crn Protein bestimmt wurde. Dies wurde in einem Western Blot mittels Wildtypembryonenextrakten und den erhaltenen Aliquots des aufgereinigten Antikörpers überprüft und bestätigt (Abb.55D). Auch die beschriebene zweite, schwache Bande unterhalb der 88kDa Bande wurde beobachtet (Pfeil Abb.55D). Das aufgereinigte Serum wurde in einer Verdünnung von 1 : 500 eingesetzt.

Immunolokalisationsexperimente von Raisin-Tani und Léopold an Embryonen zeigten ubiquitäre Verteilung des Proteins bezogen auf sowohl die diversen Gewebetypen als auch auf die verschiedenen Stadien der Embryogenese. Beschrieben wird weiter, daß auf subzellulärem Niveau ein Großteil des Proteins im Nucleus zu finden ist. Dies ist in distinkten, sog. „speckles“ (Flecken) lokalisiert, die als Speicher der meisten Spleißfaktoren und einiger Transkriptionenzyme beschrieben worden sind (Raisin-Tani and Leopold, 2002). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Western Blot Analysen, in denen das Protein nur in nucleären, nicht aber cytoplasmatischen Fraktionen detektiert werden konnte (Raisin-Tani and Leopold, 2002).

Diese Ergebnisse sollen im folgenden mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten verglichen werden. *crn* Antikörperfärbungen an *whole mount* Embryonen erzielten weder durch konventionelle noch durch konfokale Analyse mit unterschiedlich gewählten Antikörperverdünnungen und Fixierungsprotokollen reproduzierbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Um *crn* ektopisch exprimieren zu können, wurde die erhaltene *crooked neck* cDNA (Zhang et al., 1991) in den pUAST Expressionsvektor kloniert und transgene Stämme etabliert. Neben der Analyse der pUAST*crn* vermittelten ektopischen Crn Expression erlaubt das GAL4 System weitere Expressionsstudien. Über Aktivatorstämme (siehe Material und Methoden) wurden die Auswirkungen ektopischer Crn Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Keine der untersuchten Aktivator-/Effektorkombinationen führte zu einer Letalität oder reduzierter Vitalität der Nachkommen. Auch generierte die ektopische Crn Expression keinen identifizierbaren dominanten Phänotyp.

Im Embryo wurden die Aktivatorstämme *Kr GAL4*, *rho GAL4*, *elav GAL4*, *da GAL4*, *24B GAL4* und *A2(loco) GAL4* für eine genauere Analyse benutzt. Die ektopische *crn* Expression in diesen Geweben führt zu keiner Letalität (s.o.). Mittels verschiedener Antikörperfärbungen wurden Embryonen dieser Kreuzungen gefärbt und auf Phänotypen gesichtet. Die hierzu eingesetzten Antikörper waren anti-Repo, anti-Futsch und anti- β -Tubulin. Es konnten jedoch keine Abweichungen von der wildtypischen Verteilung der jeweiligen Expressionsmuster der Antikörper gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression der UAS*Crn* Konstrukte mittels des Aktivators *en GAL4* in embryonalen Stadien wurde zur Analyse der subzellulären Verteilung des ektopischen Crn Proteins benutzt (Abb.55E). Diese Daten belegen, daß durch das UAS*Crn* Konstrukt das Protein in den *engrailed* Expressionsdomänen des Aktivators ektopisch mittels des anti-Crn Antikörpers nachgewiesen werden kann (Abb.55E). Dies ist in frühen wie in späten Stadien der Embryogenese zu erkennen (Abb.55E oben, Stadium 11; unten, Stadium 16). Die subzelluläre Lokalisation des ektopischen Proteins ist sowohl im Nucleus, als auch eindeutig cytoplasmatisch präsent (Pfeil Abb.55E).

Die subzelluläre Lokalisation des Crn Proteins wurde ebenfalls in *Drosophila* S2 Schneiderzellen determiniert (Abb.55A bis C). Das Signal findet sich überwiegend in den Nuclei der Zellen (Pfeil Abb.55A). Das Protein ist jedoch nicht ausschließlich dort lokalisiert. Geringere Mengen finden sich außerhalb des Nucleus, wie die Vergrößerung in Abb.55C erkennen läßt (Pfeil). Diese Verteilung erscheint punktiert und ähnelt damit der Verteilung innerhalb des Nucleus. Die Phalloidin Färbung der S2 Zellen diente der Visualisierung des Cytoskeletts (Abb.55B).

Zur weiteren Analyse des *crn* Ausfallphänotyps wurde mittels des RNAi Vektors pWIZ (Karte ist dem Anhang beigelegt; Abb.50) ein *crn*RNAi Konstrukt erstellt. Nach Keimbahntransformation wurden *crn*pWIZ Insertion tragende Stämme etabliert. Wie zuvor schon für das *crn*pUAST Konstrukt beschrieben, wurden verschiedene Aktivatorlinien benutzt, um das Gen *crooked neck* zell- und kontextspezifisch auszuschalten. In keiner der analysierten Kombinationen führte dies zu Letalität oder adulten dominanten Phänotypen. In diesem Zusammenhang

wurde untersucht, ob das Migrationsverhalten der Retinobasalgliazellen (RBG) durch den *crn* Ausfall beeinträchtigt wird. Via *eyeless* GAL4 und *repo* GAL4 wurde das *crnpWIZ* Konstrukt in der Augenimaginalscheibe und damit im möglichen Substrat dieser Gliazellmigration oder in den RBG exprimiert. Die Migration der RBG, analysiert durch den anti-Repo Antikörper, verläuft in diesen Augenimaginalscheiben jedoch wildtypisch. Auch die Photorezeptorneurone und deren Axone zeigen keine Abweichungen vom Wildtyp. Umgekehrt wurde durch den *loco* GAL4 Aktivator das *crnpWIZ* Konstrukt in den RBG exprimiert. Genau wie zuvor beschrieben, konnte kein Effekt dieser Expression auf die Migration der RBG festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, daß das *crnpWIZ* Konstrukt in der Fliege nicht funktionell ist oder daß die benutzten Insertionen das Snapbackkonstrukt in zu geringem Maße exprimieren, um das endogene *crn* über die RNAi Maschinerie zu entfernen. Weitere Studien wurden aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

3.10.4 Phänotypische Charakterisierung von *crooked neck*

3.10.4.1 Der *crooked neck* mutante Kutikulaphänotyp

Mutationen des Gens *crn* wurden bereits 1984 durch Perrimon et al. beschrieben (Perrimon et al., 1984). Kutikulaphänotypen aus dieser Publikation sind in Abb.56 dargestellt. Zwei *crooked neck* Allele wurden dort charakterisiert: *EA130* und *RC63*. Der Phänotyp in Abb.56D stellt den schwächsten der dort gefundenen Phänotypen dar, der in Abb.56B den stärksten. Der Phänotyp weiblicher Embryonen, die heterozygot für *crn* Allele und die Defizienz *Df (1)64c18* sind, zeigt einen ähnlichen aber extremeren Phänotyp (Perrimon et al., 1984). Der Kutikulaphänotyp der Embryonen ist nur zu erkennen, wenn die Tiere in der Vitellinmembran verbleiben, da die Kutikula samt der Dentikelbänder ansonsten wildtypisch differenziert wird. *crn* mutante Tiere weisen „Dellen“ (Pfeil Abb.56E und D) auf. Einige Tiere wirken entlang der longitudinalen Achse verdreht, was zur Namensgebung des Gens *crooked neck* („krummer Hals“) führte (Abb.56B)(Perrimon et al., 1984). Die im Screen isolierten Allele zeigen überwiegend schwächere Phänotypen als die von Perrimon et al. beschriebenen. In keinem Embryo konnte eine extreme „Halseinschnürung“ beobachtet werden. Dies läßt auf einen hypomorphen Charakter beider Allele schließen. Das schwächere der beiden

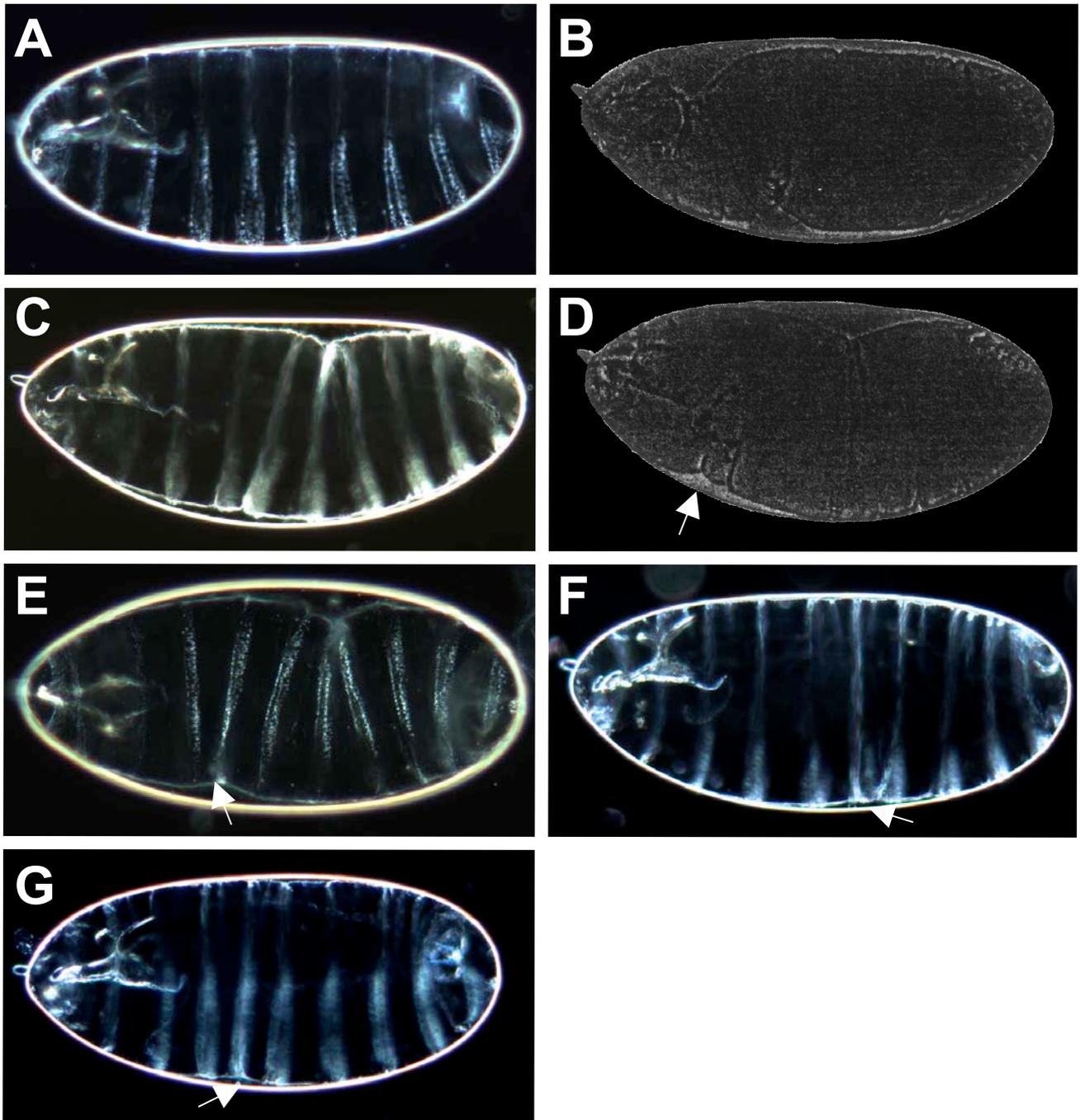


Abb.56: Kutikulaphänotypen *crooked neck* mutanter Embryonen

A Wildtyp **B** *cm* Kutikulapräparat Perrimon et al.,1984 **C** *crn^{III-26H8}* **D** *cm* Kutikulapräparat Perrimon et al.,1984 **E** *crn^{III-26H8}* **F und G** *crn^{IX-15H6}*

Kutikulapräparationen mit Vitellinmembran; anterior ist links, ventral ist unten. Phasenkontrastaufnahmen hemizygoter *cm* mutanter Embryonen. Die in **B** und **D** dargestellten Embryonen entstammen der Publikation, in der dieser Phänotyp erstmalig beschrieben wurde (Perrimon et. al., 1994). Die Embryonen erscheinen „ingedellt“, teils entlang ihrer longitudinalen Achsen verdreht (Pfeile **E** und **D**). Dies ist in der *crn^{IX-15H6}* Mutante weniger stark ausgeprägt (Pfeile **F** und **G**), und in vielen Embryonen nicht zu beobachten.

Allele ist $crn^{IX-15H6}$. In diesen Embryonen ist der Kutikulaphänotyp oft gar nicht zu finden oder nur sehr geringfügig ausgeprägt (Pfeile Abb.56E und F).

3.10.4.2 ZNS Phänotypen *crooked neck* mutanter Embryonen

ZNS Defekte in crn mutanten Embryonen wurden 1991 erstmalig beschrieben (Zhang et al., 1991). Im Gegensatz zur dortigen phänotypischen Beschreibung treten im Allel $crn^{III-26H8}$ eindeutig stärkere ZNS Phänotypen auf. Die ZNS Phänotypen $crn^{IX-15H6}$ mutanter Embryonen sind vergleichbar mit denen, die von Zhang et al. beschrieben werden. Die ZNS Phänotypen der im Screen isolierten Allele sind in Abb.57 dargestellt. Das axonale ZNS Muster wurde mittels des mAb BP102 analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp sind in $crn^{III-26H8}$ Mutanten der Verlust und die Desorganisation sowohl kommissuraler Fasern als auch eine deutliche Reduktion der Konnektive zu erkennen (Pfeile Abb.57B). In einigen Bereichen scheinen kommissurale Axone auch ektopisch in Richtung Peripherie zu projizieren (Pfeilköpfe Abb.57B). In seltenen Fällen sind Embryonen mit weniger starken Defekten zu finden, die dem Phänotyp des Stammes $crn^{IX-15H6}$ entsprechen (vgl. Abb.57C und D). Das ZNS mutanter $crn^{IX-15H6}$ Embryonen weist fusionierte, bisweilen defaszikulierte Kommissuren und zum Teil reduzierte Konnektive auf (schwarzer Pfeil Abb.57D). Die Fusion der Kommissuren ist moderat; anteriore und posteriore Kommissur können unterschieden werden, und es existiert ein intrakommissuraler Raum (weißer Pfeil Abb.57D). Die Zellkörper der VUM Neurone sind vorhanden, deren axonale Projektion ist jedoch teils fehlerhaft (Daten nicht gezeigt).

3.10.4.3 Muskeldefekte *crooked neck* mutanter Embryonen

Ein anderer Prozeß während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila*, der Migrationsprozessen und enger Zell-Zellkommunikation bedarf, ist die Entwicklung der somatischen Muskulatur. Diese besteht aus ca. 30 segmentalen Muskeln, gebildet in der zweiten Hälfte der Embryogenese. Während der frühen Embryonalentwicklung fusionieren die sog. Gründerzellen mit somatischen Mesodermzellen, um so die syncytialen Muskelfasern zu bilden. Während der folgenden Extension des Muskels entsendet dieser Filopodien, welche seine Wegfindung zu den epidermalen Anheftungsstellen leiten (Bate, 1993).

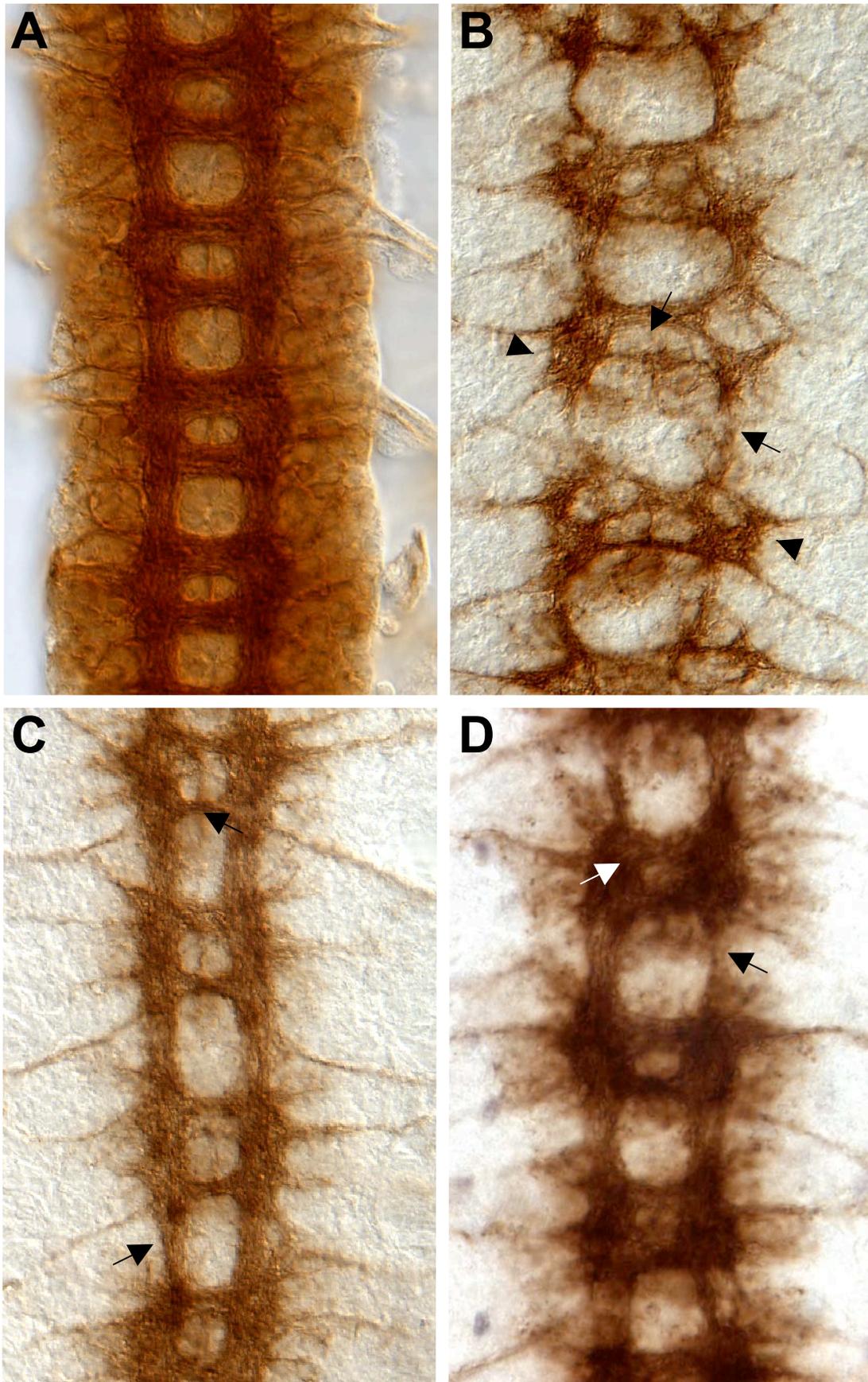


Abb.57: ZNS Phänotypen *crooked neck* mutanter Embryonen

A Wildtyp **B** *crn^{III-26H8}* **C** *crn^{III-26H8}* **D** *crn^{IX-15H6}*

ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben. Das axonale Muster wurde mit dem mAb BP102 analysiert. *crn^{III-26H8}* mutante Embryonen führen im ZNS zu reduzierten Kommissuren und Konnektiven in unterschiedlichen Ausprägungen (vgl. Pfeile **B** und **C**). In *crn^{IX-15H6}* mutanten Tieren ist die Ausprägung des ZNS Phänotyps schwächer. Die Konnektive sind reduziert und die Kommissuren wirken leicht fusioniert (Pfeil **D**).

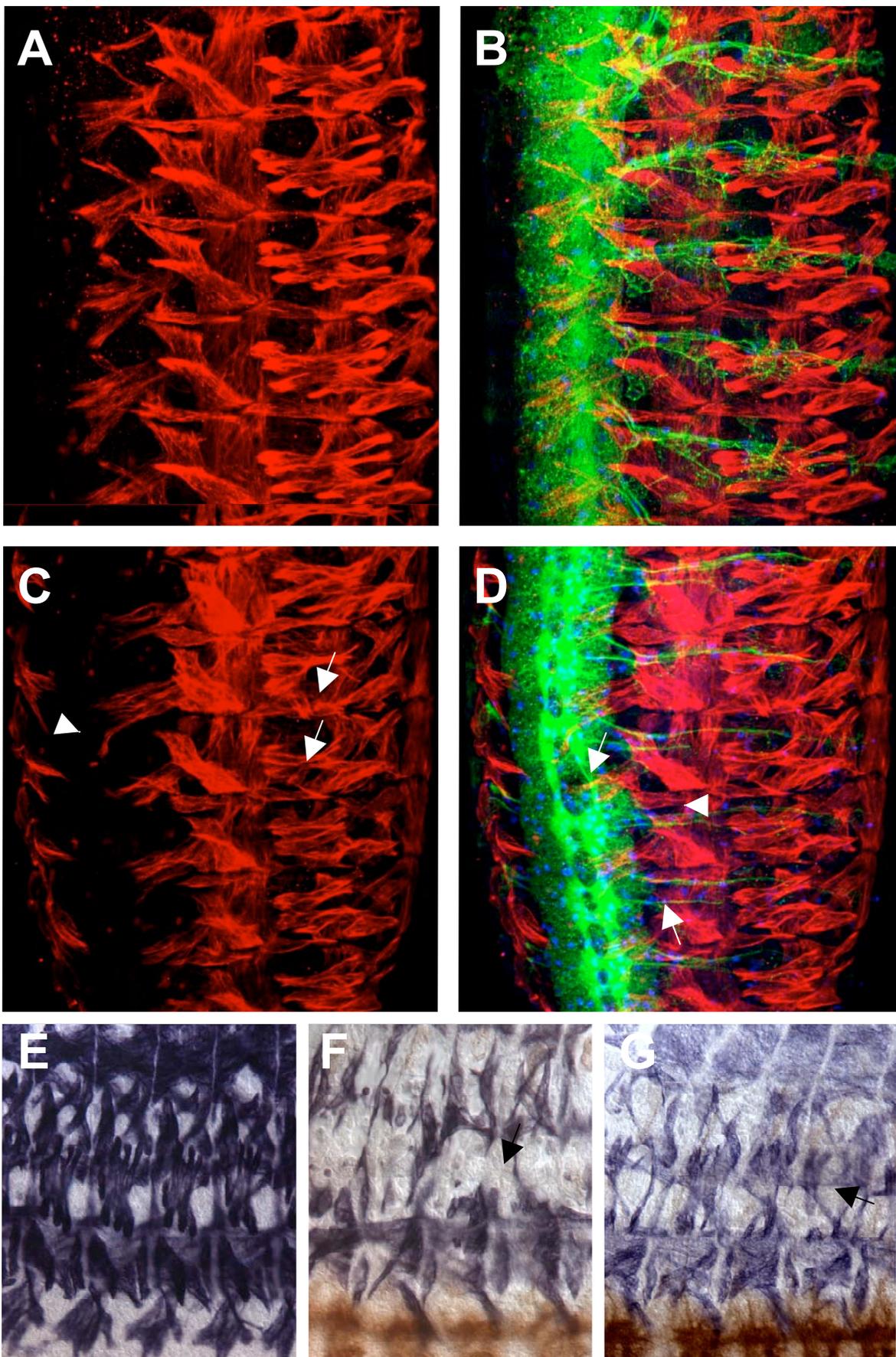


Abb.58: Muskeldefekte *crooked neck* mutanter Embryonen

A und B Wildtyp **C und D** *crn^{IX-15H6}* **E** Wildtyp **F** *crn^{IX-15H6}* **G** *crn^{III-26H8}*

A bis D konfokale Analyse von Stadium 16 *whole mount* Embryonen (somatische Muskulatur via anti- β -tubulin in rot, Neurone markiert mittels anti-HRP in grün, Gliazellen durch anti-Repo in blau visualisiert). Anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. **E bis F** PNS Präparationen: somatische Muskulatur via anti- β -tubulin in blau, Axone des ZNS in **F** und **G** mittels mAb BP102 markiert. Das ZNS ist unten, anterior ist links. *crn* mutante Embryonen besitzen unterschiedliche Qualitäten von Muskeldefekten. Details siehe Text.

Somatische Muskulaturdefekte *crooked neck* mutanter Embryonen wurden mit Hilfe des anti- β -Tubulin Antikörpers analysiert (Abb.58). In Stadium 16 *crn*^{IX-15H6} mutanten Embryonen kommt es zu einer geringen Reduktion der Anzahl der somatischen Muskeln (Pfeile Abb.58 C und D). Besonders scheint dies die lateralen transversalen Muskeln zu betreffen (unterer Pfeil Abb.58C). Neben dem Verlust treten aber auch Formveränderungen bzw. fehlpositionierte Muskelansatzstellen auf (oberer Pfeil Abb.58C). Die Expressivität des Phänotyps ist variabel. Die Anheftung der Muskeln an die Epidermis verläuft oft unregelmäßig, nicht konform mit dem wildtypischen Muster. In anderen Embryonen - mit hoher Penetranz im Allel *crn*^{III-26H8} - fehlen viele Muskeln (Pfeil Abb.58F). Auch die ventrale Muskulatur erscheint in *crn* mutanten Embryonen ungleich dem Wildtyp zu weit ventral (vgl. Pfeilkopf Abb.58C).

3.10.4.4 Terminale Differenzierungsdefekte der peripheren Gliazellen in *crooked neck* mutanten Embryonen

Die terminale Differenzierung der peripheren Gliazellen im *Drosophila* Embryo bedeutet die Umhüllung der Axone durch die Gliazellen, um die Axone von der Hämolymphe abzuschirmen und neuronale Reiztransduktion zu gewährleisten. Gegen Ende der Embryogenese umhüllen diese Gliazellen fast komplett die Axone des PNS. Um mögliche Defekte in dieser terminalen Differenzierung der Gliazellen detektieren zu können, wurde eine Rekombinante aus einem *MZ97 GAL4* Aktivatorstamm und einem *UASactGFP* Effektorstamm erstellt. Diese Kombination aus *MZ97 GAL4* und *UASactGFP* erlaubt die cytoplasmatische Visualisierung eines Subsets der peripheren Gliazellen, der auch die ventrale periphere Gliazelle mit einschließt, und der Oenocyten. Dieses Expressionsmuster wurde konfokal untersucht und beschrieben (vgl. Abb.9 und 59A und C). Die Umhüllung des Segmentalnervs geschieht v.a. durch die ventrale periphere Gliazelle (Pfeil Abb.59 C) angedeutet sind.

Das rekombinierte Chromosom wurde in den genetischen Hintergrund der *crn*^{IX-15H6} Mutante gebracht und so konnte die Differenzierung der peripheren Gliazellen analysiert werden. In Stadium 16 mutanten *crn*^{IX-15H6} Embryonen ist der Differenzierungsdefekt anhand der gut zu identifizierenden ventralen peripheren

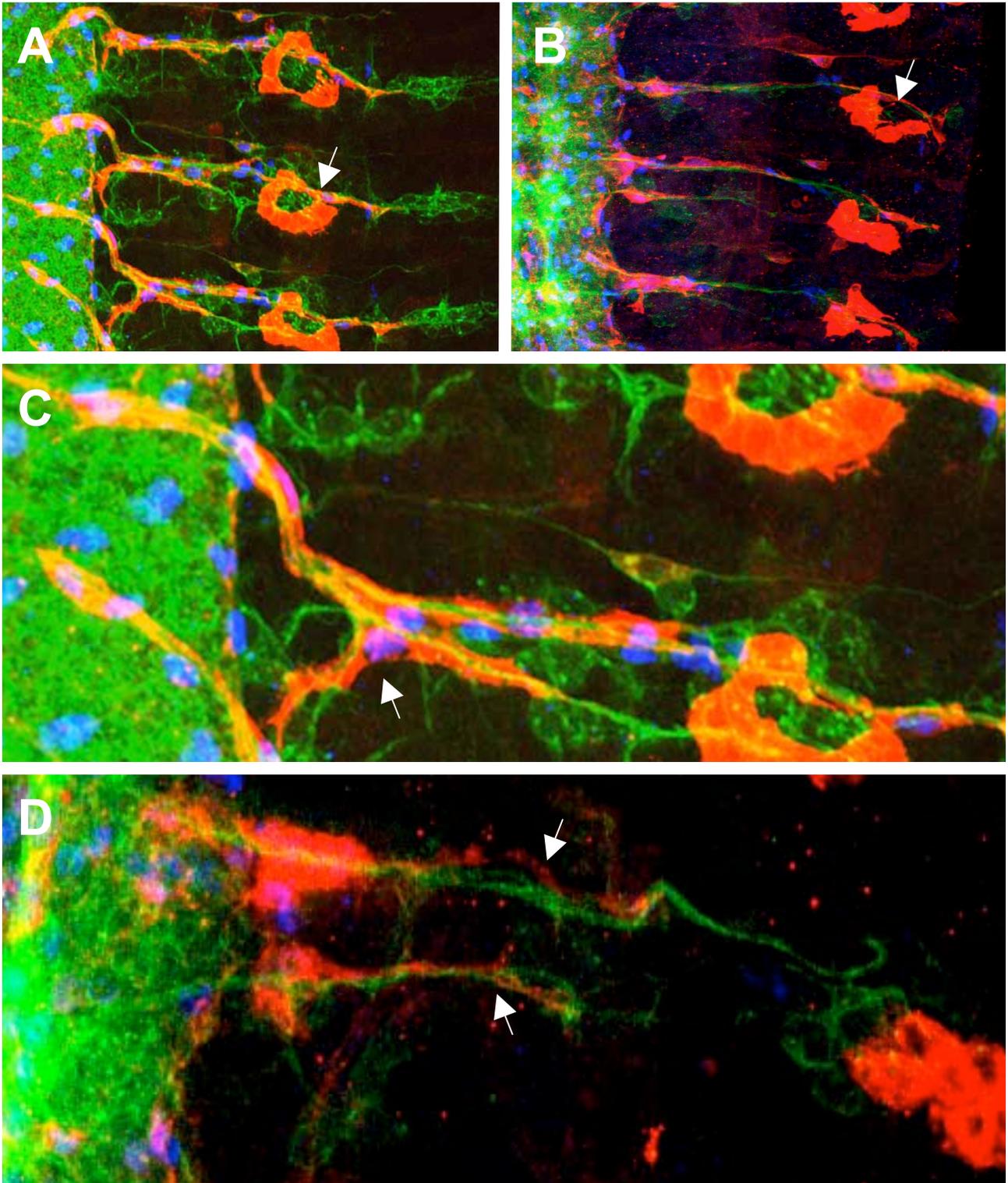


Abb.59: Differenzierungsdefekte peripherer Gliazellen in *crooked neck* mutanten Embryonen

A und C MZ97GAL4/UASactGFP **B und D** *crn^{IX-15H6}*; MZ97GAL4/UASactGFP

Konfokale Analyse von Stadium 16 *whole mount* Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist links. Markierung des neuronalen Musters (anti-HRP in grün), der Glia nuclei (anti-Repo in blau) und eines Subsets der peripheren Gliazellen (anti-GFP in rot) mit ihren cytoplasmatischen Ausläufern. In Endstadien der Embryogenese umhüllen die peripheren Gliazellen die Axone des PNS fast komplett (Pfeile **C**). In *crooked neck* mutanten Embryonen sind dort nur dünne Fortsätze zu erkennen (Pfeile **D**). Auch die Oenocyten zeigen deutliche Phänotypen, die ringförmige Struktur ist unterbrochen (vgl. Pfeile **A** und **B**).

Gliazelle zu erkennen. Das Cytoplasma der Zelle ist primär um den Kern zu finden, statt sich, wie im Wildtyp, entlang des Segmentalnervs zu verteilen und diesen zu umhüllen. In der Mutante entsenden die peripheren Gliazellen dennoch ihre Fortsätze die Axone entlang. Es sind dünne cytoplasmatische Ausläufer der Gliazellen zu erkennen, die erst an Stellen terminieren, an denen die Zelle im Wildtyp ihre größte Ausdehnung hat (vgl. z.B. rechter Pfeil Abb.59C mit unterem Pfeil 59D).

Die Morphologie der Oenocyten ist in *crn^{IX-15H6}* Embryonen ebenfalls gestört. Über die embryonale Funktion dieser Zellen ist bisher nichts bekannt. Das Gen *slit* oder der ansonsten rein gliaspezifische *MZ97* GAL4 Aktivatorstamm werden in diesen Zellen exprimiert. Ein im Screen gefundenes Allel induziert ektopisch die *J29* Expression in diesen Zellen. Zudem wurde die Position und Morphologie der Oenocyten im Wildtyp konfokal in hoher Auflösung analysiert (Daten nicht gezeigt). Eine anti-FasIII Färbung zeigte keine Expression in diesen Zellen. Die Oenocyten schließen exakt mit den Chordotonalorganen ab und bilden dadurch in Stadium 16 Embryonen eine ringförmige Struktur um die Chordotonalorgane des PNS. Zudem befanden sich, wie durch eine Z-Auflösung gezeigt werden konnte, die Oenocyten als „Puffer“ zwischen Epidermis und Chordotonalorganen. Die Oenocyten *crn^{IX-15H6}* mutanter Stadium 16 Embryonen bilden oftmals keine ringförmige Struktur um die Chordotonalorgane aus (vgl. Pfeile Abb.59A und C). Es kann jedoch nicht differenziert werden, ob dieser Defekt durch eine Fehlpositionierung der Oenocyten oder durch die unregelmäßig angeordneten Chordotonalorgane (die in einigen Mutanten auch reduziert sind) hervorgerufen wird. Eine Analyse dieses Phänotyps könnte Aufschlüsse über Zell-Zellkommunikationen oder Migration der Oenocyten geben.

3.10.4.4.5 Ultrastrukturelle Analyse des glialen Phänotyps von *crooked neck*

Um die im Lichtmikroskop beobachteten Phänotypen genauer zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Mit Hilfe von GFP exprimierenden Balancetieren konnten mutante Embryonen vor der Fixierung selektioniert werden. Die Ergebnisse der ultrastrukturellen Analyse sind in den Abb.60 und 61 zusammengefaßt.

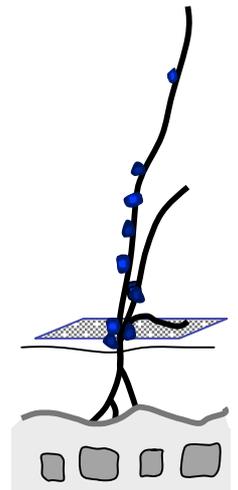
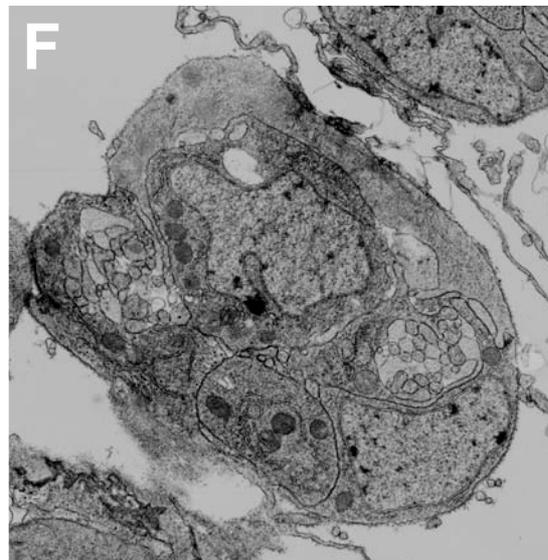
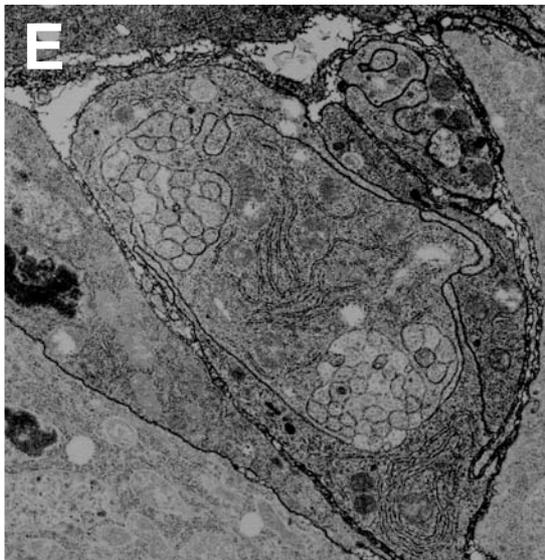
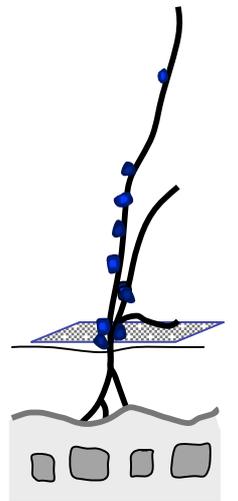
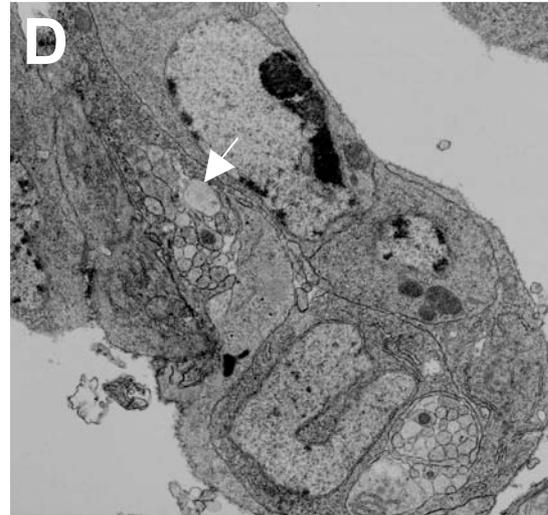
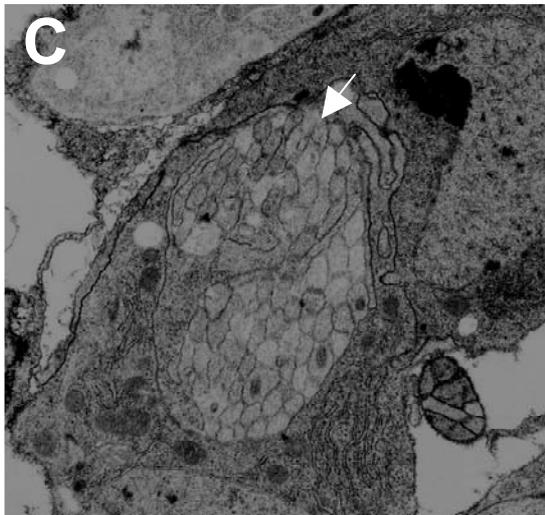
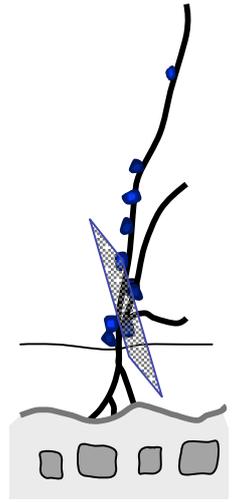
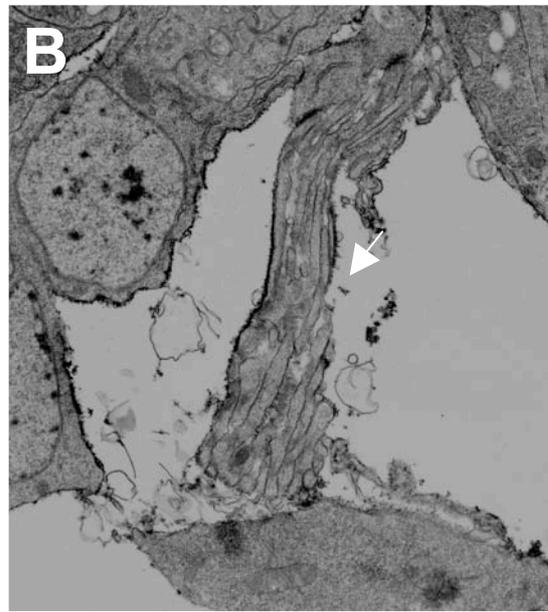
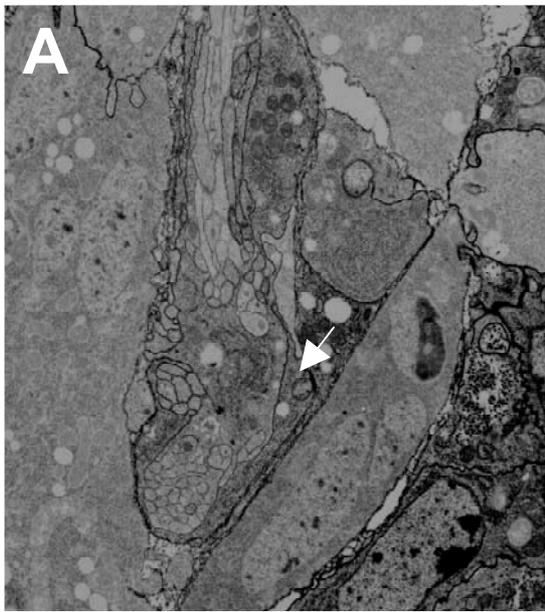


Abb.60: Ultrastrukturelle Analyse des *crooked neck* mutanten Phänotyps - I

A,C und E Wildtyp **B,D und F** *cm^{IX-15H6}* **rechte Spalte** Darstellung der ungefähren Schnittebenen (Das ZNS ist unten; anterior ist links. Die PNS Axone sind in schwarz, die Nuclei der peripheren Gliazellen sind in blau dargestellt. Die Raute markiert die Schnittebene)

Ultradünnschnitte von Stadium 16 Embryonen. Man erkennt die Axone des SN und ISN sowie die Umhüllung dieser durch die peripheren Gliazellen. In *cm^{IX-15H6}* Mutanten umhüllen die Gliazellen die Axone weiter dorsal immer unvollständiger. Es wurden Bilder gewählt, die sich in den Schnittebenen wildtypischer und mutanter Embryonen ungefähr entsprechen. Die Mutante ist rechts, dem Wildtyp gegenüberliegend abgebildet.

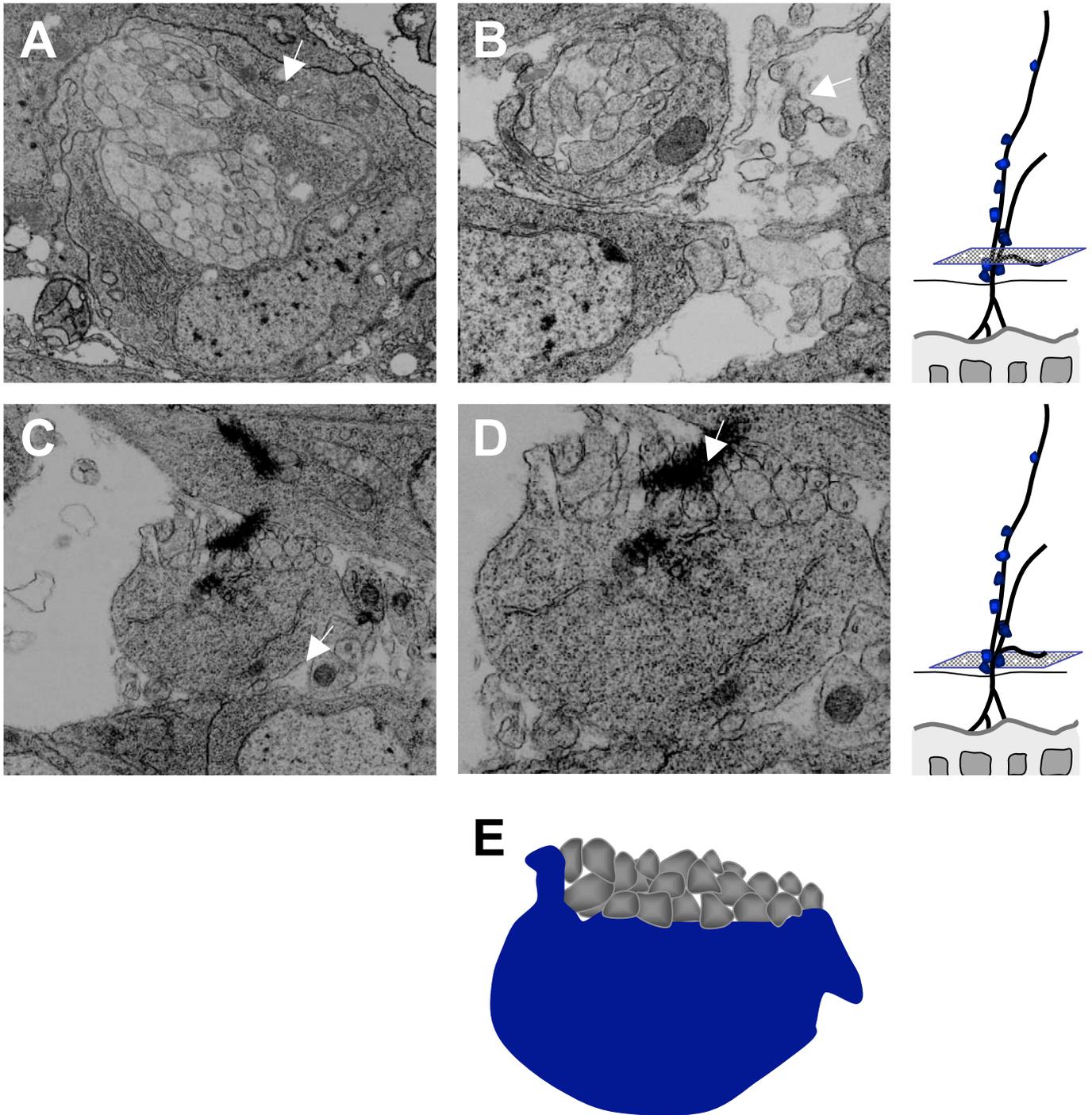


Abb.61: Ultrastrukturelle Analyse des *crooked neck* mutanten Phänotyps - II

A Wildtyp **B,C und D** *crn^{IX-15H6}* **E** Schema der glialen Umhüllungsdefekte in *crn^{IX-15H6}* mutanten Embryonen **rechte Spalte** Darstellung der ungefähren Schnittebenen (Das ZNS ist unten; anterior ist links. Die PNS Axone sind in schwarz, die Nuclei der peripheren Gliazellen sind in blau dargestellt. Die Raute markiert die Schnittebene)

Ultradünnschnitte von Stadium 16 Embryonen. Man erkennt die Axone des SN und ISN sowie die Umhüllung dieser durch die peripheren Gliazellen. In *crn^{IX-15H6}* Mutanten umhüllen die Gliazellen die Axone unvollständig und es entstehen Lücken (vgl. Pfeile **A** und **B,C**). In einigen Fällen differenzieren die Gliazellen sehr unvollständig und in Bereichen umgeben die peripheren Gliazellen die Axone nur an einer Seite (Pfeil **D**; Schema in **E**).

In wildtypischen Segmenten des Stadium 16 werden die Axone des SN und ISN in den ventraleren Bereichen des PNS bereits vollständig durch die peripheren Gliazellen umhüllt. In *crooked neck* mutanten Embryonen zeigen die peripheren Gliazellen deutliche Differenzierungsdefekte. Die Gliazellen sind vorhanden, doch umhüllen sie die Axone weiter dorsal immer unvollständiger und die faszikuläre Struktur der Axone wird aufgehoben (vgl. Pfeile Abb.60C und D). In sagittaler Schnittebene weiter dorsal Axone im Längsschnitt treffend, ist zu erkennen, daß diese nicht mehr von Gliazellen flankiert werden (vgl. Pfeile Abb.60A und B).

In Abb.61 sind die Differenzierungsdefekte in der *crn* Mutante eingehender dargestellt. Ein Teil der Axone wird durch Gliazellen umhüllt, ein anderer liegt frei und defaszikuliert daneben (vgl. Pfeile Abb.61A und B). Abb.61D stellt eine Vergrößerung aus C dar. Die Fehldifferenzierung der Gliazelle ist eindeutig zu erkennen. Die Gliazelle umhüllt die Axone nicht mehr. Es scheint, als lägen die Axone in einem lockeren Verband an einer Seite der Gliazelle auf (Pfeil Abb.61D). Die Gliazelle ist jedoch nicht komplett dissoziiert von den Axonen, sondern es scheint, als bilde sie eine Art „Winkel“ um zu beginnen, die Axone zu umhüllen. Das Schema in E verdeutlicht dies. Bis jetzt konnte noch nicht beschrieben werden, wie die peripheren Gliazellen Axone umhüllen. Die EM Analyse des *crooked neck* mutanten Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp gibt zum ersten Mal Hinweise diesbezüglich. Die Gliazelle scheint zunächst lange Fortsätze entlang des Axons zu senden, bevor sie beginnt, die Axone seitlich zu umhüllen.

3.10.4.6 Klonale Analyse der RBG Migration in *crn*^{IX-15H6} Mutanten mittels der ey-FLP Technik

Da die EMS-induzierten *crn*^{IX-15H6} und *crn*^{III-26H8} Allele zu embryonaler Letalität führen, wurden wie zuvor beschrieben, auch diese Mutationen auf ein, die *19AFRT* Insertion tragendes, Chromosom rekombiniert. Jede der Spalten in Abb.62 stellt eine Augenimaginalscheibe mit unterschiedlichen Einzelfärbungen oder Überlagerungen dieser dar. In der ersten Reihe ist eine dreifache Überlagerung der Antikörpersignale zu sehen. Die zweite kombiniert die anti-Repo Färbung, die die Glia nuclei in blau markiert und die anti-GFP Färbung. Anhand der anti-GFP Färbung in rot können

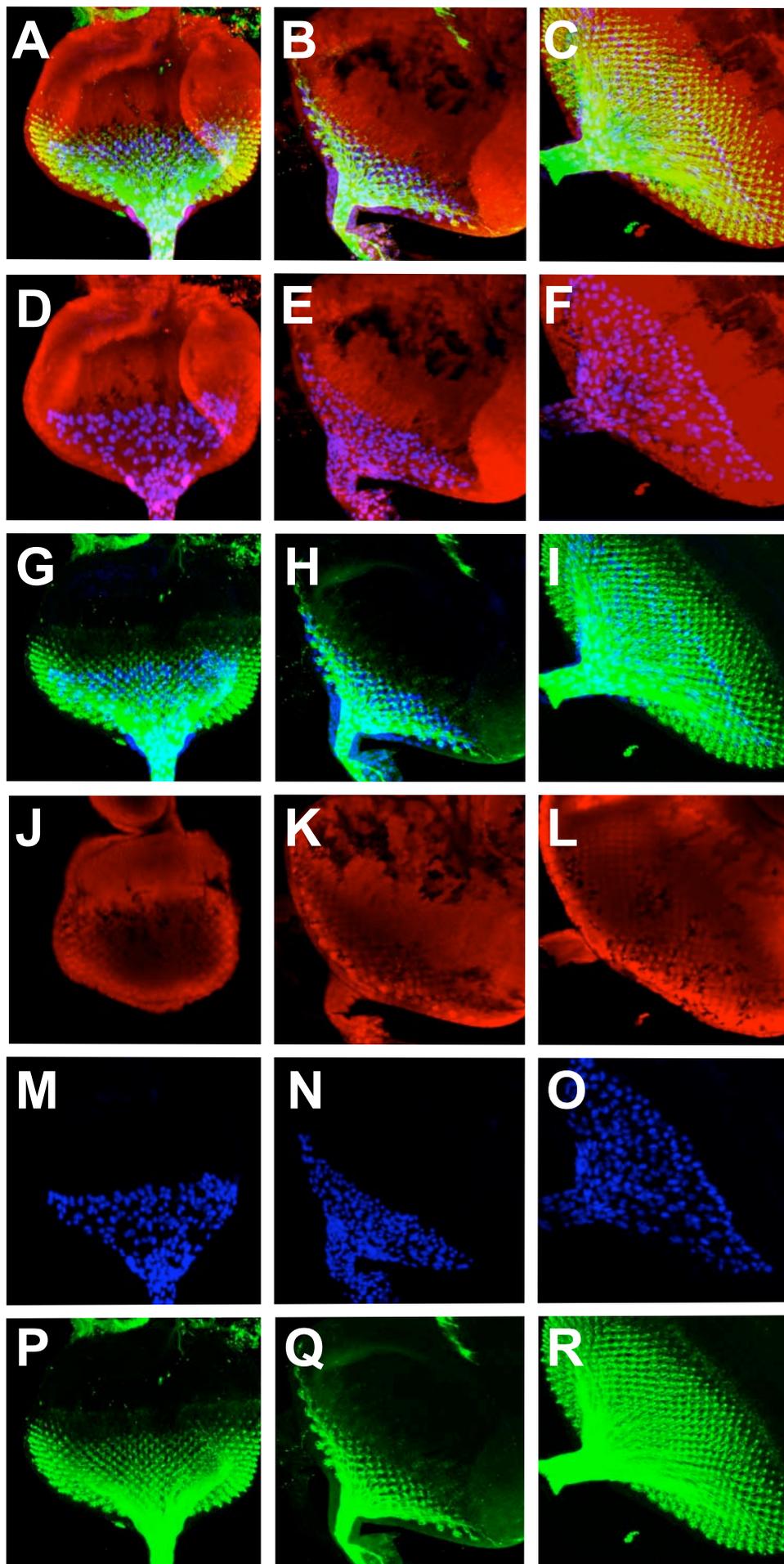


Abb.62: Konfokale Analyse von *crn*^{IX-15H6} mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe

Jede Spalte stellt eine Augenimaginalscheibe dar. Die Klone wurden mittels der ey-FLP Technik generiert. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glia nuclei mit anti-Repo in blau und nicht-mutante Bereiche sind via anti-GFP in rot markiert. Anterior ist oben. Details siehe Text.

klonale und nicht-klonale Bereiche diskriminiert werden. Es wurde neben den dargestellten markierten Klonen eine größere Anzahl an nicht-markierten, klonalen Augenimaginalscheiben untersucht (Daten nicht gezeigt). Aus dieser Analyse gingen keine Phänotypen hervor, die von den beschriebenen Phänotypen des *FM7c* Balancers abwichen. Die Phänotypen, die in markierten Augenimaginalscheiben analysiert wurden, zeigten überwiegend wildtypische RBG Migration. Dennoch traten in einigen Fällen unregelmäßige Migrationsphänotypen (Abb.62N) auf. Die hier dargestellten Klone sind jedoch sehr klein daher ungenügend. Zudem steht die klonale Analyse *crn^{III-26H8}* mutanter Klone noch aus.

3.10.5 Analyse der RBG Migration im Wildtyp und in *crn^{IX-15H6}* Mutanten mit Hilfe des MARCM Systems

Die Anwendung des MARCM Systems (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) erlaubt die dominante Markierung von Zellklonen eines bestimmten Gewebes und gleichzeitige Analyse des Ausfalls bestimmter Genfunktionen in diesen Zellen. Ein dominanter Repressor eines Zellmarkers wird genetisch in *trans* zu einem mutanten Gen von Interesse gebracht. Ereignisse mitotischer Rekombinationen zwischen den homologen Chromosomen erzeugen homozygot mutante Zellen, die als einzige markiert werden, da der Repressor in diesen Zellen gleichzeitig wegsegregiert (Lee and Luo, 1999). Mit diesem System bietet sich die Möglichkeit, die RBG in der Augenimaginalscheibe mit Hilfe eines membrangebundenen GFP Markers als Ganzes, d.h. mit ihren Fortsätzen zu analysieren und evtl. weitere Aufschlüsse über das Migrationsverhalten dieser zu gewinnen.

3.10.5.1 Analyse der wildtypischen Morphologie und Migration der RBG im Wildtyp mit Hilfe des MARCM Systems

Das MARCM System bietet die Möglichkeit, die Retinobasalgliazellen detaillierter zu beschreiben, da einzelne Zellen markiert und die Fortsätze dieser Zellen in hohen Auflösungen dargestellt werden können. In Abb.63 und in Abb.64 im Detail sind MARCM Klone (markiert via *daughterless* GAL4 und UASmCD8GFP) dargestellt. In der linken Spalte ist ein besonders großflächiger Klon markiert. Diese

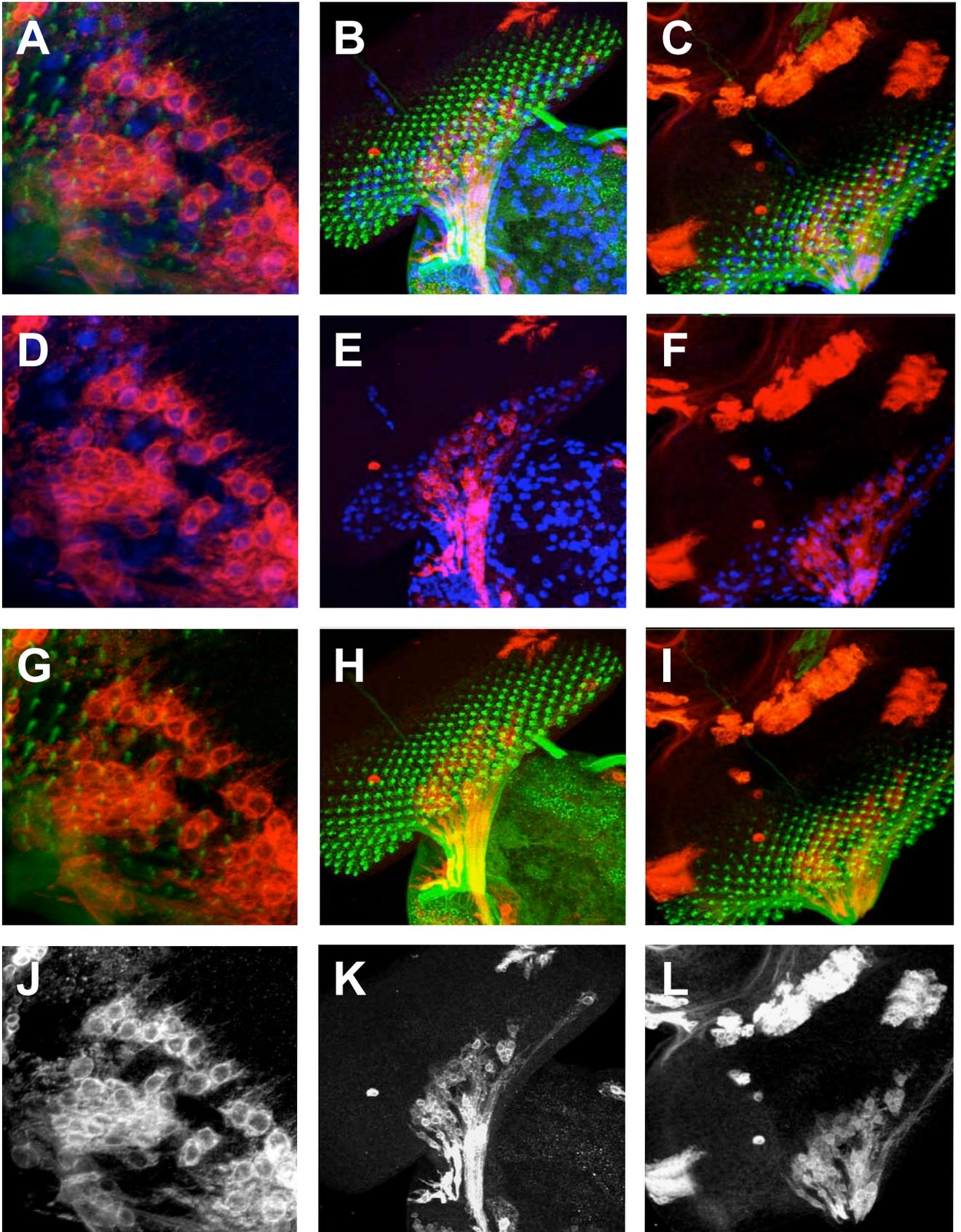


Abb.63: Konfokale, klonale Analyse der wildtypischen RBG Migration in der Augenimaginalscheibe durch das MARCM System - I

Jede Spalte stelle eine wildtypische Augenimaginalscheibe dar. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glianuclei mit anti-Repo in blau und klonale Zellen sind via anti-GFP (in rot bzw. grau) markiert. Die unterste Reihe stellt die klonalen Bereiche in Grautönen dar. Anterior ist oben. Details siehe Text.

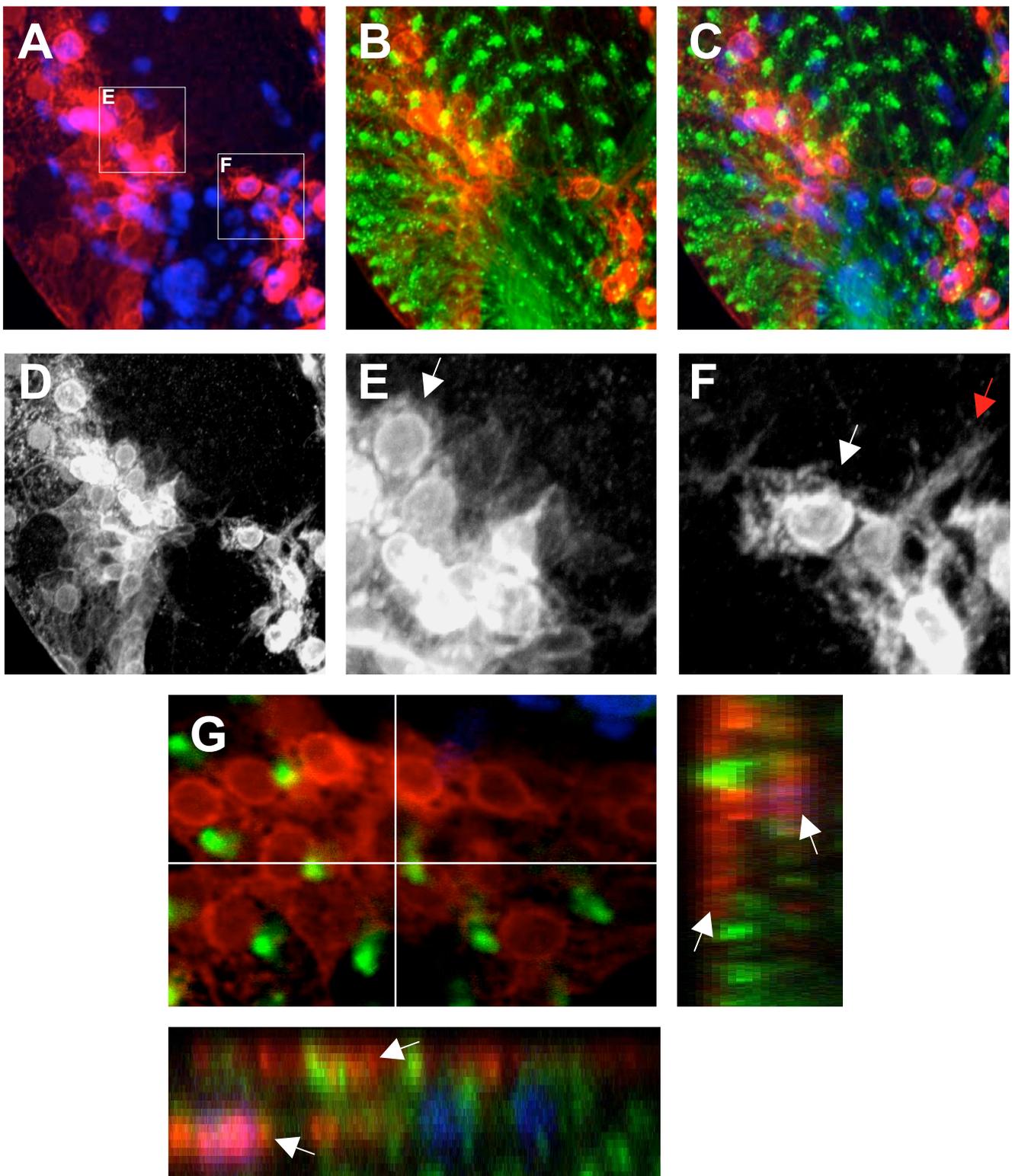


Abb.64: Konfokale, klonale Analyse der wildtypischen RBG Migration in der Augenimaginalscheibe durch das MARCM System - II

A bis C dominant markierte Klone in der Augenimaginalscheibe Übersicht **D bis F** Detailansichten der klonalen Bereiche **G** Auflösung eines klonalen Bereichs in der Z - Ebene (Die weißen Linien geben die ungefähren Positionen dieser Z-Ebenen an.)

Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glia nuclei mit anti-Repo in blau und klonale Zellen sind via anti-GFP (in rot bzw. grau) markiert. Abb. **D bis F** stellen die klonalen Bereiche in Grautönen dar. Die RBG mit ihren cytoplasmatischen Fortsätzen sind in hoher Auflösung dargestellt. Die Markierung der Klone erlaubt die Detektion von Zellen mit gliazellähnlicher Morphologie, die keine anti-Repo Färbung zeigen. Vgl. Pfeile **E** (Repo-negativ) und **F** (Repo-positiv) und Pfeile in **G**.

Zellen scheinen ausschließlich anti-Repo positive Nuclei zu besitzen. Anterior ist ein Band von Gliazellen zu sehen. Diese Gliazellen migrieren in vorderster Front. Die Zellen sind sehr einheitlich in bezug auf Größe, Abstand zueinander, Beschaffenheit und Länge ihrer Fortsätze. Fast alle Fortsätze zeigen nach anterior. Weiter posterior in der zweiten, dritten, oder vierten Reihe der markierten Gliazellen scheinen sie sich auch nach dorsal oder ventral zu orientieren.

In der mittleren und rechten Spalte abgebildet sind Klone, in denen morphologisch sehr unterschiedliche Gliazellen markiert sind. Im optischen Stiel und am Rand der Augenimaginalscheiben befinden sich sehr langgestreckte RBG. In Mitte der Augenimaginalscheiben sind die zuvor beschriebenen einheitlich runden RBG zu sehen. In diesen beiden Augenimaginalscheiben ist auch zu beobachten, daß es v.a. am Rand und im Übergang zum optischen Stiel graduelle Abstufungen dieser beiden Formen gibt. Weiter zum posterioren Rand hin elongieren die Zellen, bis im optischen Stiel extensiv lange und massiven Gliazellen zu sehen sind (v.a. Abb.63 H und K). Die bisweilen auch sehr langen Fortsätze der Gliazellen an vorderster Migrationsfront können sich über eine Länge von bis zu zwei Zelldurchmessern erstrecken (roter Pfeil Abb.64F). Zudem kann man Zellklone oberhalb der morphogenetischen Furche erkennen. Da durch die ubiquitäre Aktivierung der FLP Rekombinase mittels *daughterless* GAL4 ubiquitär Klone in der Augenimaginalscheibe markiert werden, sind nicht alle Zellen glialen Ursprungs.

Es konnten auch Zellen mit gliaähnlicher Zellmorphologie markiert werden, die nicht anti-Repo positiv sind (Abb.64). Abb.64 E und F bieten einen Vergleich dieser Zellen: links in E sind zwei Zellen ohne Repofärbung (Pfeil) zu sehen und die in F dargestellten Zellen sind Repo positive Gliazellen. Diese beiden Zelltypen scheinen sich in ihrer Form und Größe nicht zu unterscheiden. Die Fortsätze unterscheiden sich jedoch: Die in E erscheinen breiter und saumartiger als die speichenförmigen Fortsätze der Repo positiven Gliazellen (vgl. Pfeile E und F). Die Auflösung der Zellen in der Z-Ebene wurde durch die Rekonstruktion eines konfokalen Datenstapels mit der Volocitysoftware (Improvision) erzeugt (flankierende Teilbilder Abb.64G). Die nicht-Repo positiven Zellen befinden sich direkt apikal zu den Repo positiven Gliazellen. Beide Zellebenen sind innerhalb der Ebene der Photorezeptoraxone (Pfeile Abb.64G) zu finden, wie durch die anti-HRP Färbung

deutlich wird. Bisher wurde die Repoexpression als Marker aller Gliazellen beschrieben. Aufgrund der geringen Anzahl an klonalen Ereignissen, die gefunden wurden, konnte diese Art von Zellen nur in wenigen Fällen beobachtet werden. Daher steht die weitere Analyse dieser Zellen noch aus, es läßt sich jedoch vermuten, daß es Repo negative Gliazellen gibt.

In Abb.65 sind in hoher Auflösung die Gliazellen dargestellt, die sich am Rand der Augenimaginalscheibe befinden (Pfeil Abb.65C). Die Zellen samt ihrer Fortsätze sind sehr lang und bewegen sich entlang zahlreicher Axone (Abb.65E). In den Abb.65B, D und F sind Vergrößerungen der Fortsätze dargestellt. Die Richtung, in die diese weisen, sind gleich (nach anterior bzw. posterior) in der Augenimaginalscheibe ausgerichtet. Da all diese Fortsätze mit Axonen assoziiert zu sein scheinen, kann auf ein haptotaktisches Signal geschlossen werden. Auch die überwiegende Anzahl der kleinsten, detektierbaren Fortsätze sind in Richtung der morphogenetischen Furche ausgerichtet (Pfeile Abb.65F).

3.10.5.2 Analyse der Morphologie und Migration der RBG *crn*^{IX-15H6} Mutanten mit Hilfe des MARCM Systems

Die Morphologie der Gliazellen wurde auch in *crn*^{IX-15H6} mutanten MARCM Klonen untersucht (Abb.66 und Abb.67). Diese Klone wurden markiert durch die Verwendung eines *repo* GAL4 Aktivatorstammes und den Effektorstamm UASmCD8GFP. Bei den hier gezeigten Analysen ist zu beachten, daß klonale Ereignisse in Geweben, in denen *repo* GAL4 nicht exprimiert wird, nicht detektiert werden können. Es kann nicht unterschieden werden, ob diese Augenimaginalscheiben rein gliale Klone besitzen oder auch z.B. benachbarte neuronale Klone. Die Frequenz der MARCM Klone war sehr gering, so daß in bezug auf die Beschreibung eines *crn* mutanten Phänotyps lediglich erste Hinweise gegeben werden können.

Die Gliazellen scheinen trotz Verlust der *crn* Genfunktion in ihrer morphologischen Organisation keine Defekte zu besitzen. In der mittleren Reihe in Abb.66 ist ein Klon in den bereits für den Wildtyp beschriebenen, langgestreckten Gliazellen des optischen Stiels dargestellt (Abb.66.F). In der obersten Reihe

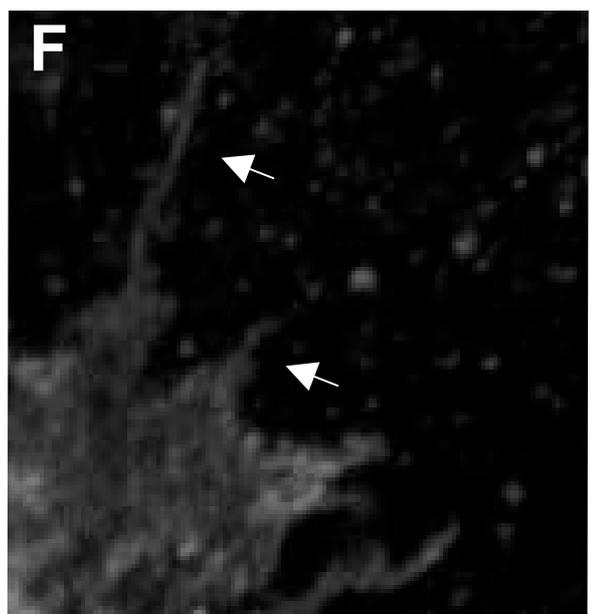
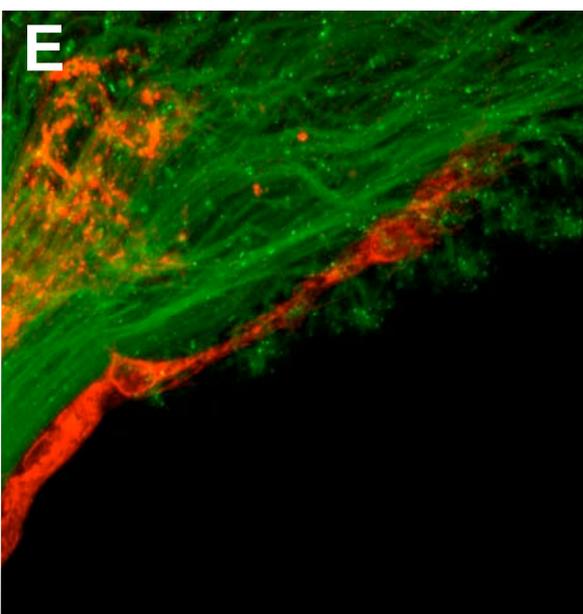
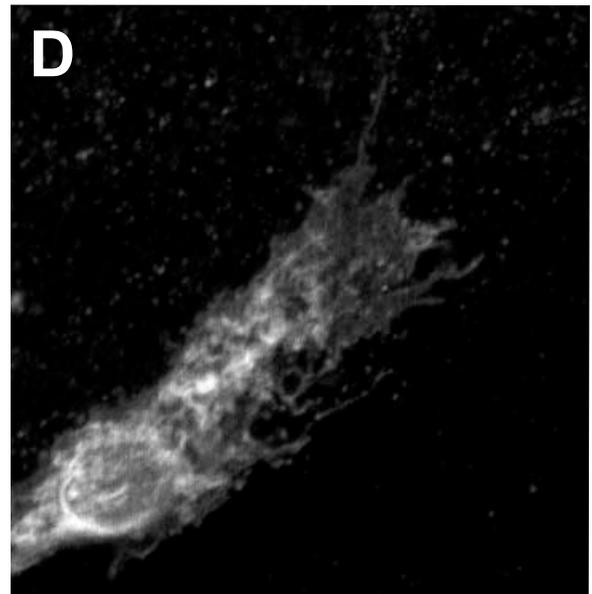
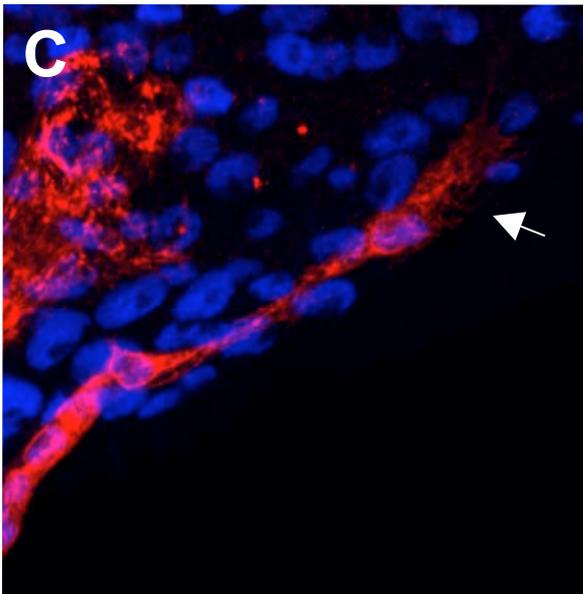
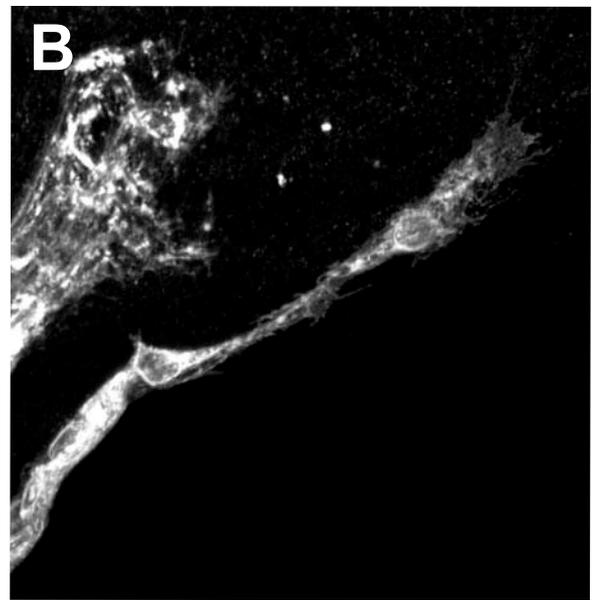
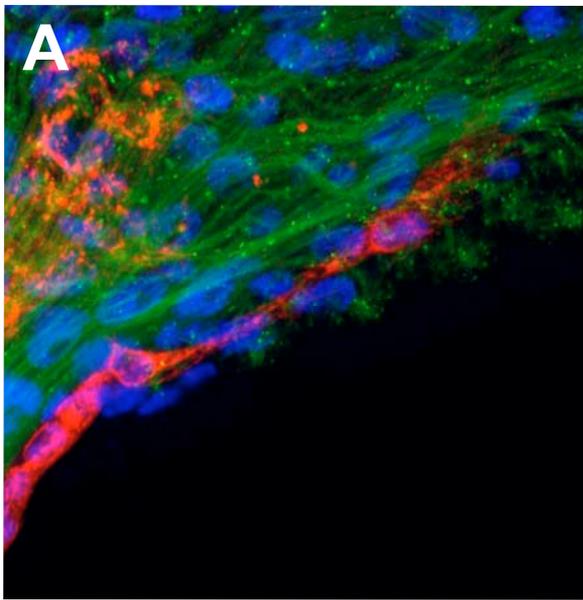


Abb.65: Konfokale, klonale Analyse der wildtypischen RBG Migration am Rand der Augenimaginalscheibe durch das MARCM System - III

A,C und E dominant markierte Klone in der Augenimaginalscheibe **B,D und F** Vergrößerungen der Gliazelle (Pfeil **C**) zur besseren Kontrastierung in grau dargestellt

Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glia nuclei mit anti-Repo in blau und klonale Zellen sind via anti-GFP (in rot bzw. grau) markiert. Details siehe Text.

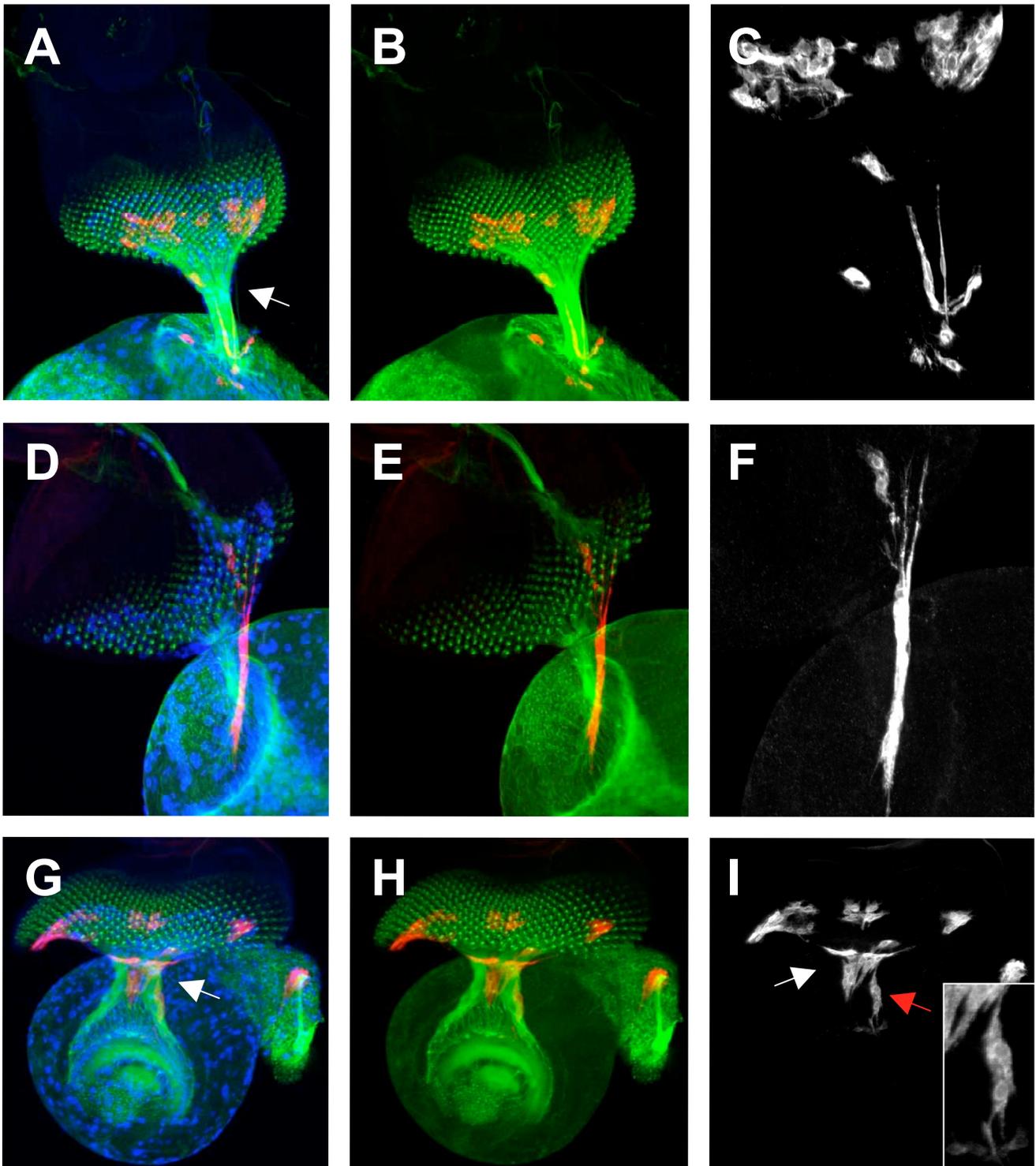


Abb.66: Konfokale, klonale Analyse *crooked neck* mutanter Gliazellen - I

A bis I dominant markierte *crn^{IX-15H6}* mutante Klone Repo-positiver Gliazellen in der Augenimaginalscheibe

In jeder Reihe ist eine Augenimaginalscheibe samt optischem Lobus abgebildet. In der rechten Spalte sind die *crooked neck* mutanten Bereiche zur besseren Kontrastierung in grau dargestellt. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glianuclei mit anti-Repo in blau und klonale Zellen sind via anti-GFP (in rot bzw. grau) markiert. Details siehe Text.

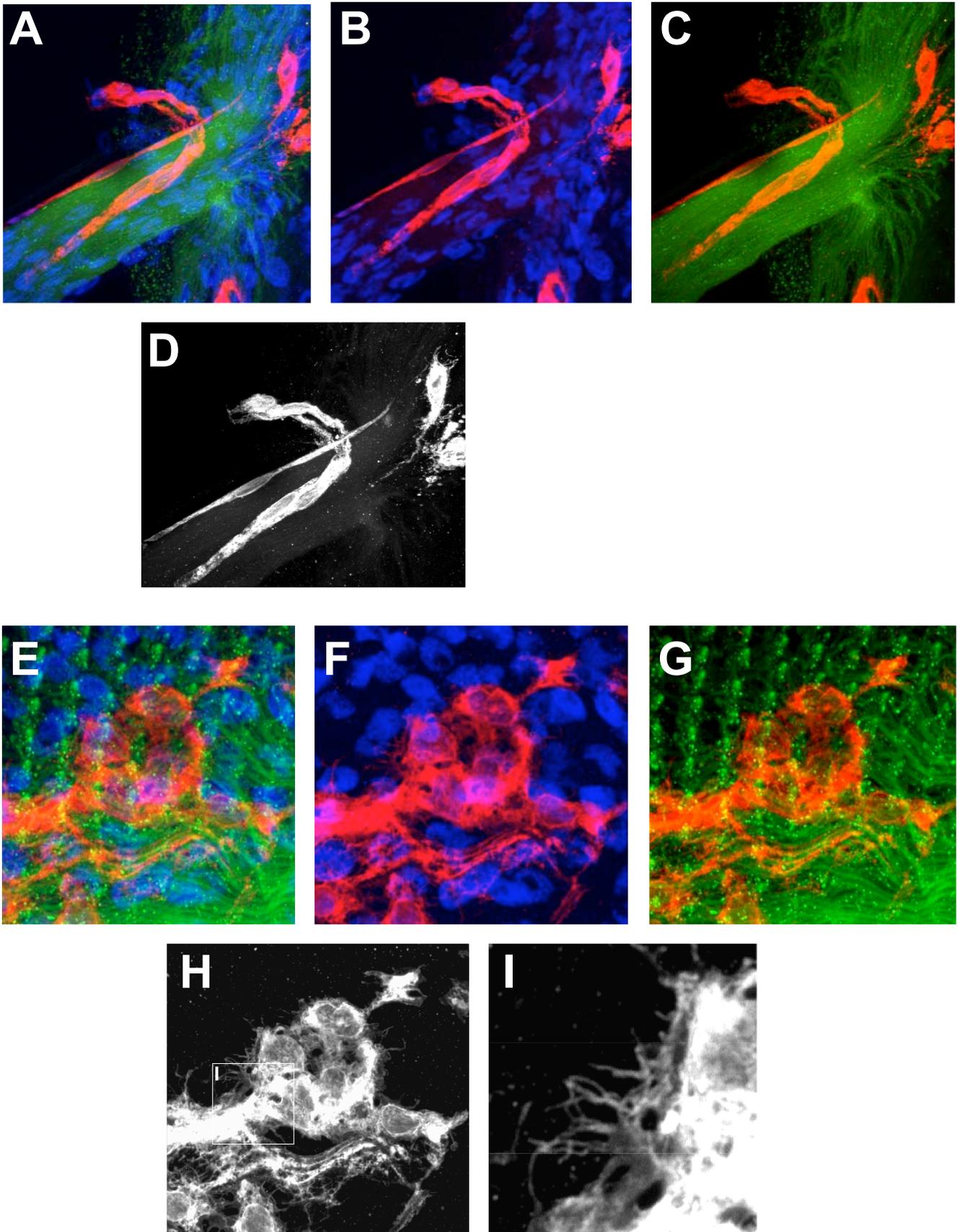


Abb.67: Konfokale, klonale Analyse *crooked neck* mutanter Gliazellen - II

A bis D dominant markierte *crn^{IX-15H6}* mutante Klone Repo-positiver Gliazellen entlang des optischen Stiels **E bis I** dominant markierte *crn^{IX-15H6}* mutante Klone Repo-positiver Gliazellen in der Augenimaginalscheibe

Unterschiedliche Bereiche der Augenimaginalscheibe sind dargestellt. Die *crooked neck* mutanten Gliazellen sind in **D,E,I** und **J** zur besseren Kontrastierung in grau abgebildet. Neurone sind mit anti-HRP in grün, Glia nuclei mit anti-Repo in blau und klonale Zellen sind via anti-GFP (in rot bzw. grau) markiert. Details siehe Text.

(Abb.66) sind sowohl diese als auch die „runderen“ Zellen in der Scheibe markiert. Es sind keine Unterschiede zum Wildtyp festzustellen. Zwei der zehn analysierten Augenimaginalscheiben, von denen eine in der untersten Reihe in Abb.66 dargestellt ist, zeigen auffällige Defekte. Der optische Stiel, der normalerweise die Axone gebündelt enthält, ist verbreitert (vgl. Pfeile Abb.66A und D). Diese Verbreiterung korreliert mit sich am Rand der Augenimaginalscheibe befindlichen *crn* mutanten Klonen (Pfeil Abb.66I). Zudem sind an der Stelle einige *crn* mutante, markierte Gliazellen zu sehen, die aufgrund ihrer Morphologie eher den runden, nicht elongierten Zellen entsprechen (roter Pfeil Abb.66I und Kasten Abb.66I). Dies muß jedoch nicht unbedingt einem mutanten Phänotyp entsprechen. Bemerkenswert ist jedoch, daß keine der klonalen Zellen hier diesem Gliazelltyp entsprechen (Abb.66I).

In Abb.67 sind analog zu den in Abb.64 im Wildtyp dargestellten MARCM Klonen *crn* mutante Gliazellklone in hoher Auflösung abgebildet. Die Fortsätze der Gliazellen im optischen Stiel (Abb.67E bis I) in den betrachteten Beispielen sehen wildtypisch aus. Die Detailanalyse läßt erkennen, daß die Fortsätze der Gliazellen innerhalb der Fläche der Augenimaginalscheibe (Abb.67A bis D) ebenfalls wildtypisch erscheinen. Die Richtung der Fortsätze entspricht dem Wildtyp. Wie beschrieben, besitzen die Gliazellen, die zwischen morphogenetischer Furche und optischem Stiel lokalisiert sind, oft Fortsätze, die nicht nur nach anterior gerichtet sind, sondern auch nach dorsal und ventral hin (Abb.67I).

3.10.6 Phänotypische Analyse des Gens *held out wings (how)* als möglichem Interaktionspartner von *crooked neck*

Das Gen *held out wings (how)* codiert ein RNA bindendes Protein, welches in zwei Isoformen, How (small/S) und How (long/L) auftritt. Diese beiden Varianten unterscheiden sich nur durch ihren C-Terminus. How (L) besitzt ein nucleäres Retentionssignal, How (S) Expression ist sowohl im Nucleus als auch im Cytoplasma zu finden. Es konnte gezeigt werden, daß How (L) eine verfrühte Reifung der Muskelansatzstellen (tendon cells) verhindert, indem es *stripe* mRNA Level reprimiert (Nabel-Rosen et al., 1999), How (S) aber hebt die *stripe* mRNA Level an. Diese Aktivität wird durch die 3'UTR von *stripe* vermittelt. Bei Coexpression von beiden Varianten wirkt How (S) direkt der How(L) Repression entgegen. How (S)

und How (L) haben entgegengesetzte Funktionen, die Stabilisierung bzw. Repression der *stripe* mRNA betreffend. Sie stellen eine Art Schalter zwischen Differenzierung und Reifung der Muskelansatzstellen dar (Nabel-Rosen et al., 2002).

How (S) und How (L) werden ebenfalls in den peripheren Gliazellen exprimiert (T.Volk, persönliche Mitteilung). *how* mutante Embryonen weisen Muskeldefekte auf, die denen *crn* mutanter Embryonen ähneln. Die Muskelansatzstellen sind atypisch positioniert, Muskelfasern sind zum Teil kugelig abgerundet oder fehlen teilweise ganz (Baehrecke, 1997). Zudem deuten Ergebnisse aus Co-Immunopräzipitationen darauf hin, daß Crn spezifisch im Cytoplasma mit How (S) interagieren könnte (T.Volk, persönliche Mitteilung).

3.10.6.1 Analyse der peripheren Gliazellen in *how* mutanten Embryonen

Um eine mögliche Interaktion von *how* und *crooked neck* zu untersuchen, wurde zunächst die Migration der peripheren Gliazellen in *how* mutanten Embryonen analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb.68 dargestellt. Die Markierung der peripheren Gliazellen durch den anti-Repo Antikörper zeigt, daß in *how* mutanten Embryonen die Gliamigration in einigen Segmenten gestört ist (vgl. Pfeile Abb.68B und D). Vergleichbar mit dem Phänotyp *crn* mutanter Embryonen migrieren die Gliazellen nicht in wildtypischem Ausmaß entlang der axonalen Trakte in die Peripherie. Dabei kommt es vor, daß die peripheren Gliazellen zwischen dem Segmental- und Intersegmentalnerv lokalisiert sind (Pfeil Abb.68D). Dieser *how* mutante Phänotyp ist jedoch weniger stark ausgeprägt als in *crn* mutanten Tieren. In einigen Segmenten erscheint es, als ob die Anzahl peripherer Gliazellen erhöht sei.

3.10.6.2 Neuronale PNS Defekte in *how* und *crn* mutanten Embryonen

Eine Analyse der PNS Phänotypen sind in Abb.68 für *how* bzw. im Vergleich der *crn* und *how* mutanten Phänotypen in Abb.69 dargestellt. Zur Markierung der Neurone des PNS wurden die Antikörper anti-HRP (Abb.68) und anti-Futsch (Abb.69) benutzt. *how* mutante Embryonen zeigen unterschiedliche Qualitäten von PNS Phänotypen. Abb.68E beinhaltet eine sagittale, konfokale Schnittebene, in der die ZNS Mittellinie dargestellt ist. Es ist zu sehen, daß die axonalen Trakte des

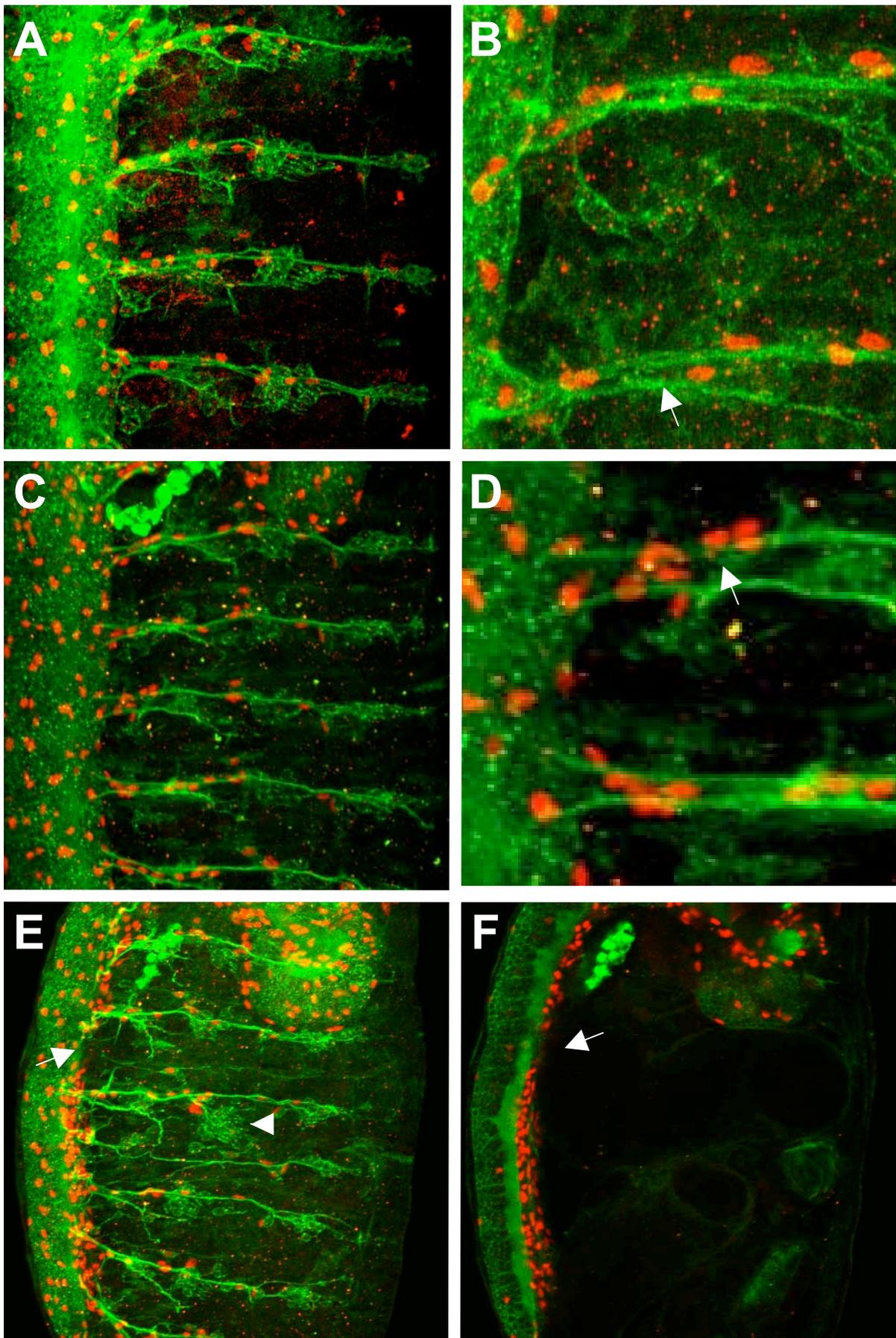


Abb.68: PNS Phänotypen *held out wings (how)* mutanter Embryonen

A,B Wildtyp **C bis F** *how*^{E44}

Konfokale Färbungen von Stadium 16 *whole mount* Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit dem anti-HRP Antikörper in grün, die peripheren Gliazellen mittels anti-Repo in rot dargestellt. In *how* mutanten Embryonen treten neuronale Defekte (Pfeil **E** und **F**). Der Pfeil in **F** deutet auf eine „Lücke“ von Neuronen und Gliazellen. Defekte in der Gliazellmigration sind zu beobachten (vgl. Pfeile **D** und **B**).

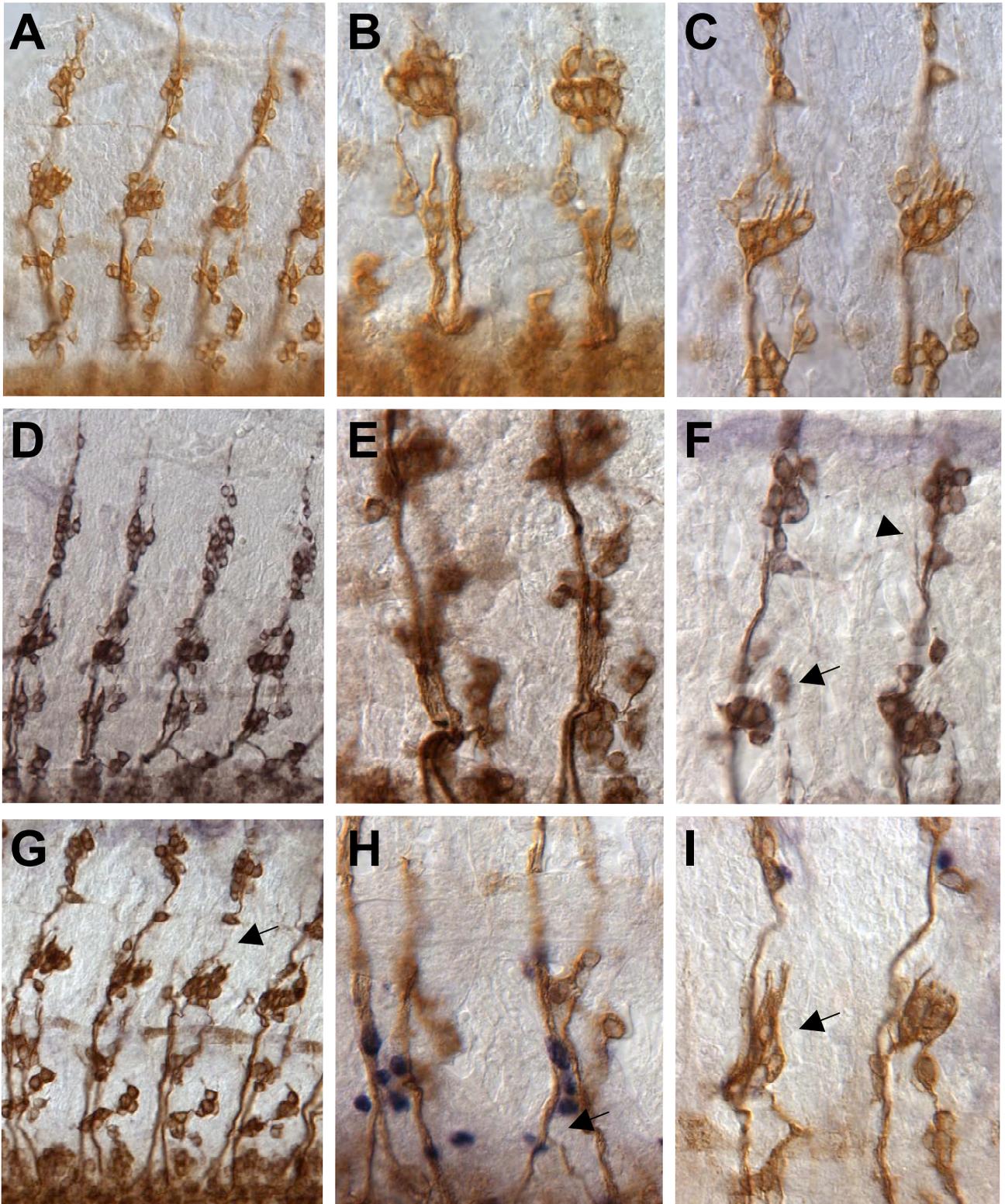


Abb.69: Vergleich neuronaler PNS Defekte von *crn*^{IX-15H6} und *how*^{E44} mutanten Embryonen

A bis C Wildtyp D bis F *how*^{E44} G bis I *crn*^{IX-15H6}

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; dorsal ist oben, das ZNS ist nach unten ausgerichtet, anterior ist links. Die Anordnung der PNS Neurone wurde mit mAb anti-Futsch visualisiert. Die erste Spalte zeigt einen Überblick, die mittlere Spalte die ZNS/PNS Übergangszone, während die rechte Spalte die laterale Gruppe genauer darstellt. In *how* und *crn* mutanten Embryonen wirken die lateralen Gruppen teils gedrungener und ungeordneter als im Wildtyp (Pfeile **F** und **I**).

Nervensystems in einem Segment fehlen (Pfeile Abb.68E und F). Im benachbarten Segment sind die Chordotonalorgane vergrößert (Pfeilkopf Abb.68E). Diese Phänotypen sind in *how* mutanten Embryonen nur in ca. einem Sechstel der Embryonen des Stadium 16 zu beobachten.

Das Gros der Phänotypen entspricht der in Abb.69 dargestellten. In dieser Abbildung wurden die neuronalen PNS Phänotypen der beiden Gene *crn* und *how* miteinander verglichen. Der Wildtyp ist in der ersten Reihe, *how* mutante Embryonen sind in der mittleren und *crn* mutante Embryonen sind in der unteren Reihe dargestellt. Die erste Spalte bietet jeweils einen Überblick über die PNS Organisation, die zweite einen Ausschnitt, der die ZNS/PNS Übergangszone umfaßt und die rechte Spalte zeigt laterale Cluster. In *crn* mutanten Embryonen sind weniger axonale Projektionen zu sehen (Pfeile Abb.69H und G). Die ventralen sensorischen Gruppen sind (besonders *crn^{III-26H8}* mutanten Tieren) ebenfalls oft reduziert (Daten nicht gezeigt). Derartige Defekte sind nur in geringer Penetranz in *how* Mutanten zu finden (vgl. Abb.69E mit H). Ob dies durch die starke maternale Komponente zu erklären ist, konnte aus Zeitgründen nicht mehr bestimmt werden. Auffällig in *crn* mutanten Embryonen ist die Reduktion der lateralen Chordotonalorgane. Sind diese in Mutanten in wildtypischer Anzahl vorhanden, wirken sie dennoch ungeordnet (Pfeil Abb.69I). Dies ist auch häufig in *how* mutanten Embryonen zu beobachten (Pfeil Abb.69F). Sowohl in *crn* als auch in *how* mutanten Embryonen scheint somit die Anordnung der lateralen Chordotonalorgane gestört. Zudem treten Projektionsdefekte der dorsalen Cluster auf (Pfeilkopf Abb.69F).

3.10.6.3 Doppelmutantenanalyse *how* und *crn* mutanter Embryonen

Eine Doppelmutantenanalyse sollte weiteren Aufschluß über eine mögliche Interaktion der Gene *crn* und *how* geben (Abb.70). Zu diesem Zweck wurden Stämme etabliert, die sowohl die Mutationen *crn^{IX-15H6}* und *how^{E44}* als auch *crn^{III-26H8}* und *how^{E44}* enthalten. Die mutanten Chromosomen wurden über entsprechende „blaue“ Balancerchromosomen stabil gehalten. So konnten die *crn* und *how* mutanten Embryonen in den Färbungen eindeutig identifiziert werden. Die Entwicklung der peripheren Gliazellen wurden mittels des anti-Repo Antikörpers analysiert. In Abb.70 sind in der rechten Spalte die Migrationsphänotypen der *crn^{IX-}*

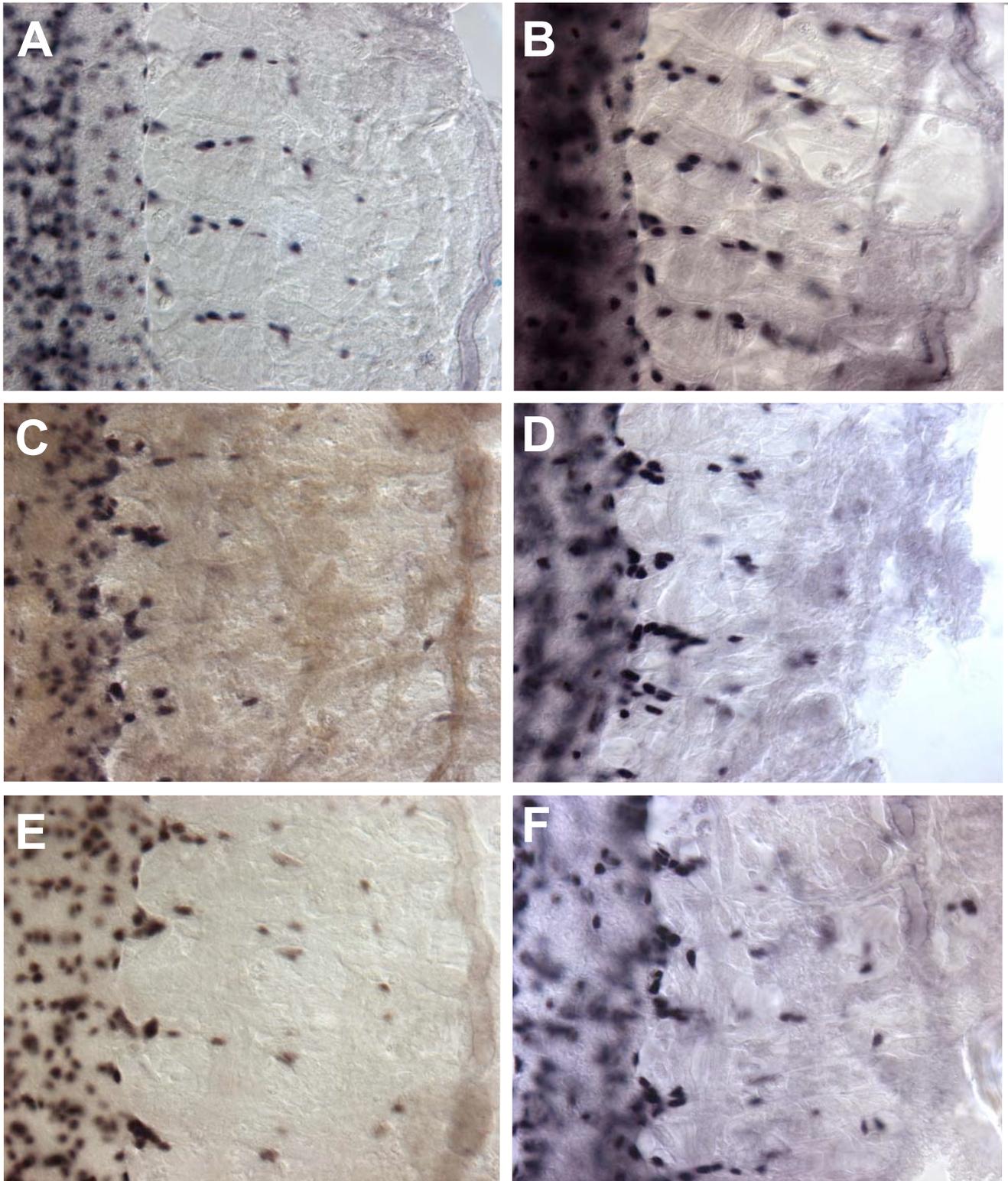


Abb.70: Analyse der peripheren Gliazellen in *crn;how* Doppelmutanten

A Wildtyp **B,D und F** *crn^{IX-15H6};;how^{E44}* **C** *crn^{III-26H8}* **E** *crn^{III-26H8};how^{E44}*

PNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen; anterior ist oben, das ZNS ist nach links ausgerichtet. Die Anordnung der Gliazellen wurde mit anti-Repo Antikörper markiert. In *crn^{IX-15H6};;how^{E44}* mutanten Embryonen ist ein variabler Phänotyp zu beobachten (vgl. **B** und **F**). Der *crn^{III-26H8};how^{E44}* mutante Phänotyp ist vergleichbar mit dem des *crn^{III-26H8}* mutanten Phänotyps (vgl. **C** und **E**).

^{15H6} und *how*^{E44} Doppelmutanten dargestellt. Die Phänotypen sind sehr variabel. Zum Teil treten Phänotypen auf, die fast wildtypisch aussehen (Abb.70B). Andere Embryonen zeigen eine Verstärkung des *crn*^{IX-15H6} mutanten Phänotyps, der dem des *crn*^{III-26H8} mutanten Phänotyps entspricht (Abb.70F). Die *crn*^{III-26H8} und *how*^{E44} mutanten Tiere entsprechen dem *crn*^{III-26H8} Ausfallphänotyp (vgl. Abb70C und E).

4 Diskussion

4.1 Konvertierung eines transkriptionellen Aktivators in einen Inaktivator

Es wurde zunächst untersucht, ob die BTB Domäne des Tramtrack Proteins als transkriptionelle Repressionsdomäne fungiert. Für die genetische Suche nach Interaktionspartnern von Genen ist eine Methode die gezielte Expression von dominant Negativen zur jeweiligen Genfunktion in bestimmten Geweben. Durch Expression einer heterologen Fusion der Pointed DNA-Bindungsdomäne und der Tramtrack BTB Interaktionsdomäne wird gezeigt, daß die Tramtrack BTB Domäne allein ausreicht, um Repression zu vermitteln. In Zukunft kann durch diese Analyse über die Expression dieser *BTB-pnt* Fusion eine Suche nach Interaktionspartnern von Pointed durchgeführt werden.

4.1.1 Die Gene *pointed* und *tramtrack*

Das Gen *pointed* (*pnt*) codiert zwei Transkriptionsaktivatoren, PointedP1 und PointedP2, die beide eine evolutiv hoch konservierte ETS DNA-Bindungsdomäne besitzen (Klämbt, 1993). Die beiden Pointed Proteine werden in vielen verschiedenen Entwicklungsprozessen gebraucht. Die Entwicklung des ventralen Ektoderms, der Tracheen und der longitudinalen Gliazellen ist abhängig von der PointedP1 Funktion (Gabay et al., 1996; Klaes et al., 1994; Samakovlis et al., 1996a), die der Mittelliniengliazellen und Photorezeptorzellen von PointedP2 (Klämbt, 1993; Scholz et al., 1993). In den beiden glialen Zellpopulationen scheinen die beiden Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Zielgene zu aktivieren, was auf eine Bedeutung von spezifischen Cofaktoren hinweist. In *pointed* mutanten Embryonen ist neben der abnormen Entwicklung der Gliazellen auch die axonale Organisation des ZNS gestört. Die Kommissuren erscheinen fusioniert. Dieser Phänotyp ist in solchen Mutanten zu beobachten, in denen die Mittelliniengliazellen Defekte aufweisen (Klämbt, 1993). Neben dem kommissuralen Phänotyp besitzen *pointed* mutante Embryonen unterbrochene, longitudinale Konnektive. Da *pointed* im Nervensystem gliaspezifisch exprimiert wird, ist zu vermuten, daß es auch eine Funktion bei der Formation der Konnektive besitzt.

Gliale Entwicklung bedarf nicht nur der Aktivierung glialer Differenzierungsgene. Gleichzeitig muß eine aktive Repression neuronaler Gene in diesen glialen Zellen stattfinden (Giesen et al., 1997). In *tramtrack* (*ttk*) Mutanten weisen die adulten Komplexaugen mehr Neurone auf, und das PNS weist Defekte auf (Guo et al., 1995; Guo et al., 1996; Xiong and Montell, 1993). Viele Zellen exprimieren das neuronale anti-Futsch Antigen, und es findet keine normale Gliazellentwicklung statt (Badenhorst, 2001; Giesen et al., 1997). Gliazellen werden in wildtypischer Anzahl geboren, aber nicht korrekt differenziert. Umgekehrt resultiert die ektopische Expression von *tramtrack* in neuronalen Zellen in einer Repression neuronaler Marker. Die Aufgabe von Tramtrack in Gliazellen scheint in der Repression neuronaler Differenzierung zu liegen.

tramtrack codiert zwei Transkriptionsfaktoren, Ttkp69 und Ttkp88 der BTB/POZ Familie (broad complex tramtrack bric a brac/pox virus and zink finger; kurz: BTB Domäne). Während der Embryogenese fungieren beiden Isoformen als transkriptionelle Repressoren (Brown and Wu, 1993; Giesen et al., 1997; Read et al., 1992). Nur Ttkp69 ist in Gliazellen exprimiert. Die BTB Domäne ist eine konservierte Region von 120 aa, oft am N-terminus von Zn-Finger enthaltenden Transkriptionsfaktoren als auch in einigen Aktin bindenden Proteinen (Zollman et al., 1994). Wie Tramtrack fungieren viele der BTB Transkriptionsfaktoren als transkriptionelle Repressoren, z.B. die Vertebraten Proteine ZID (zinc finger protein with interacting domain), BCL-6 (B-cell lymphomas 6) und BAZF (BCL-6 associated zinc finger protein)(Albagli et al., 1995; Collins et al., 2001).

4.1.2 Strukturfunktionsanalyse der Tramtrack BTB Domäne

Mutationen in den konservierten Bereichen innerhalb der BTB Domäne oder die Eliminierung der BTB Domäne resultieren in einem nahezu funktionslosen Tramtrack Protein (Badenhorst et al., 2002). Die ektopische Expression der BTB Domäne allein in einem wildtypischen Hintergrund hat keinen Effekt (Badenhorst et al., 2002). Eine der Funktionen von BTB Domänen ist Proteinmultimerformation und Selbstassoziation. Bardwell und Treisman haben 1994 die BTB Domäne als Protein-Protein Interaktionsdomäne beschrieben (Bardwell and Treisman, 1994). Kristallstrukturanalysen zeigen, daß diese Domäne homodimerisieren und vermutlich

auch oligomerisieren kann (Ahmad et al., 1998). Badenhorst et al. konnten zeigen, daß die Ttk BTB Domäne eine Präferenz zur Tetramerformation (und damit zu höheren Ordnungen) hat (Badenhorst et al., 2002). Sie belegen auch, daß die BTB Domäne nicht, wie zuvor beschrieben (Bardwell and Treisman, 1994), DNA-Bindung verhindert.

Die Funktionen der BTB Domäne sind jedoch nicht auf Multimerisation beschränkt. Es wird beschrieben, daß die Ttk BTB Domäne mit der Transkriptionsinitiation interagieren kann und so Transkription reprimieren könnte (Badenhorst et al., 2002). Alternativ wurde von BTB Domänen wie der des BCL-6 beschrieben, daß sie Corepressoren wie SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptor) rekrutieren können (Dhordain et al., 1997). Diese Corepressoren sind wiederum Teil eines Proteinkomplexes, der Histondeacetylasen enthält, welche Repression vermitteln können (Huynh and Bardwell, 1998; Wong and Privalsky, 1998).

4.1.3 Die Expression der BTB-*pnt* Proteinchimäre resultiert in einer Phänokopie *pointed* mutanter Phänotypen

Die Untersuchung transkriptioneller Regulatoren wie *pointed* oder *tramtrack* erfordert die Analyse der entsprechenden mutanten Phänotypen. Die Interpretation dieser wird erschwert durch teilweise divergierende Aufgaben, die diese Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Entwicklungsprozessen besitzen. Früh gestörte Entwicklungsprozesse maskieren in Mutanten durch die Stärke ihrer Phänotypen oft die Auswirkungen des Fehlens eines Gens zu späteren Zeiten der Entwicklung. Zudem wäre es für genetische Suchen nach Interaktionspartnern in einem Zelltyp günstig Tiere zu generieren, die nur einen mutanten Phänotyp ausprägen. Eine Methode, um dies zu bewerkstelligen, ist die gezielte Expression von dominant Negativen zur jeweiligen Genfunktion in bestimmten Geweben und Zeitpunkten.

In dieser Arbeit wurde durch Expression einer heterologen Fusion der Pointed DNA-Bindungsdomäne und der Tramtrack BTB Interaktionsdomäne gezeigt, daß die Ttk BTB Domäne allein ausreicht, um Repression zu vermitteln. Die Ergebnisse

implizieren weiter, daß diese Domäne als generelle transkriptionelle Inaktivierungsdomäne fungieren könnte. Bei Expression der Chimäre in Zellen, die normalerweise PointedP1 oder PointedP2 exprimieren, konnte eine Phänokopie der *pointed* mutanten Phänotypen generiert werden. Um zu untersuchen, ob diese Phänotypen durch die Reduktion der endogenem *pointed* Funktion entstehen, wurde der Effekt des Fusionsproteins in heterozygot *pnt*^{+/-} mutanten adulten Komplexaugen getestet. Hier konnte der Phänotyp spezifisch verstärkt werden, was auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt konnte durch die gleichzeitige Expression eines UAS *pointedP2* Konstrukts der Phänotyp deutlich abgeschwächt werden. So konnte gezeigt werden, daß die Chimäre dem Pointed Protein entgegenwirkt.

Eine Modifizierung des *BTB-pnt* Augenphänotyps durch Mutationen in beschriebenen, evtl. durch die BTB Domäne rekrutierten Corepressoren wie z.B. dCtBP, konnte nicht erreicht werden. Wen et al. haben gezeigt, daß Ttkp69 den Cofaktor dCtBP (*Drosophila* C-terminal binding protein) *in vitro* binden kann (Wen et al., 2000), welcher u.a. die Aktivität von Histondeacetylasen modulieren kann (Phippen et al., 2000). Genetische Experimente in unterschiedlichen Kontexten ergaben zum einen, daß dCtBP der Ttkp69 vermittelten Repression entgegenwirkt (Wen et al., 2000). Zum anderen wurde beschrieben, daß auf Flügeln in *tramtrack* und *dCtBP* transheterozygoten Tieren ektopische Borsten entstehen, was darauf schließen läßt, daß dCtBP hier gebraucht wird, um Transkription (proneuraler Gene) zu reprimieren (Badenhorst et al., 2002). Diese Ergebnisse und Resultate dieser Arbeit lassen daher spekulieren, daß die Funktion dieses Cofaktors eher kontext-spezifisch und modularer Natur ist.

Ob es sich bei der *BTB-pnt* vermittelten Repression um die Repression der *pointed* Zielgene auf transkriptioneller Ebene handelt, wurde mittels eines *loco* Reporterkonstruktes untersucht. In Gliazellen ist die *loco* Transkription abhängig von *glial cells missing* (*gcm*) und *pointed*. Die erste gliaspezifische Aktivierung einer *loco lacZ* Promotorfusion ist nur abhängig von Gcm (Granderath et al., 2000). Später werden durch Pointed Aktivität hohe Level von *loco* in den lateralen Gliazellen exprimiert. Wenn die *BTB-pnt* Chimäre lediglich die endogenen Pointed Level austitriert, sollte die frühe Expression des Reporterkonstruktes nicht blockiert

werden. Da diese nach früher ektopischer *BTB-pnt* Expression jedoch auch reprimiert wird, ist davon auszugehen, daß die *BTB-pnt* Chimäre die Transkription des Reporters aktiv reprimiert. Diese Ergebnisse zeigen, daß über die Expression der *BTB-pnt* Fusion in Zukunft eine Suche nach Interaktionspartnern von Pointed sehr vielversprechend ist.

Durch die Benutzung starker Aktivator- oder Effektorlinien wurden auch Phänotypen generiert, die stärker waren als die bisher beschriebenen *pointed* mutanten Phänotypen. Dies könnte daran liegen, daß bisher noch keine *pointed* Mutationen beschrieben wurden, die den Nullphänotyp von *pointed* darstellen oder daß die *BTB-pnt* Chimäre noch zusätzliche Faktoren blockiert. Auch eine andere Erklärung ist denkbar: Für die Transkription von *string* wurde gezeigt, daß diese unter der gleichzeitigen Kontrolle der Antagonisten Tramtrack und Pointed steht (Baonza et al., 2002). Die Analyse der Promotorregion ergab teils überlappende Bindungsstellen für beide Transkriptionsfaktoren. Die Expression einer *BTB-pnt* Fusion in diesem Kontext entspricht vermutlich der Überexpression von Ttk bei gleichzeitigem Verlust von *pointed* und resultiert daher in stärkeren Phänotypen. Zudem ist denkbar, die BTB Domäne Multimere mit dem wildtypischen Ttk formiert und so Ttk Funktion austitriert (Badenhorst et al., 2002). Die Überexpression der BTB Domäne im Wildtyp zeigt keinerlei Effekte. In mutanten Hintergrund jedoch (z.B. reduzierte Tramtrack oder Hairy Expression) geschieht die Formation ektopischer Borsten (Badenhorst et al., 2002). Auch in diesem Hintergrund gesehen ist eine zusätzliche, nicht rein spezifisch *pointed* Zielgene betreffende, Repression durch die Expression der *BTB-pnt* Fusion denkbar.

4.2 Etablierung eines Repressorsystems zur Inaktivierung von Genen

Durch die im letzten Kapitel beschriebenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die Ttk BTB Domäne allein ausreicht, um die Repression der Transkription zu vermitteln. Folglich könnte diese Domäne eine generelle Inaktivierungsdomäne darstellen. Mittels der Inaktivierung von Genen über lokal induzierte transkriptionelle Repression könnten transient Gene ausgeschaltet werden. In Kombination mit dem UAS/GAL4 System könnten die bestehenden Sammlungen von EP Stämmen genutzt werden, um gezielt Gene zu inaktivieren

(Brand and Perrimon, 1993). Die Expression einer Fusion der GAL4 DNA-bindenden Domäne mit der Ttk BTB Domäne sollte die UAS-Bindungsstellen eines EP Elements (Rorth et al., 1998) erkennen. Die BTB Domäne könnte dann das der EP Insertion benachbarte Gen über Chromatinmodifikationen ausschalten.

Die Expression eines Konstruktes, welches nur die Ttk BTB und die Ttk Zn-Finger DNA-Bindungsdomäne enthält, besitzt keine stark reprimierende Funktion (Badenhorst et al., 2002). Die Autoren führen dies darauf zurück, daß in dem so tranktierten Tramtrack Protein mögliche Bindungsstellen, die für die Repression benötigt werden, fehlen. Das *BTB-pnt* Fusionsprotein jedoch ist ein potenter Repressor und konvertiert den Aktivator Pointed in einen Repressor nur durch die Addition der BTB Domäne. Daher kann spekuliert werden, daß für die korrekte Funktion der BTB Domäne des GAL-BTB/BTB-GAL Fusionsproteins (und auch des tranktierten Tramtrack Proteins) die beiden Domänen nicht direkt benachbart sein dürfen. So wurde eine zweite Generation von Konstrukten kloniert, die eine Spacerregion zwischen beiden Domänen beinhaltet. Die ektopische Expression dieser Konstrukte unter der Kontrolle des *ubiquitin* Promotors resultierte jedoch ohne Anwesenheit einer EP Insertion zu einer verminderten Vitalität in den etablierten, transgenen Stämmen. Die ektopische Expression dieses Konstruktes scheint bereits ohne spezifische DNA Assoziation Defekte auszulösen. Vermutlich aufgrund der schwachen Transgenexpression der etablierten, transgenen Stämme konnte in Tests mit definierten EP Insertionen keine Repression von Genen beobachtet werden.

Dieses System müßte in Zukunft weiter ausgebaut werden. Die BTB Domäne könnte durch z.B. das sog. WRPW Motiv ersetzt werden, welche die beschriebene funktionelle Repressionsdomäne des Hairy Proteins ist. Hairy ist ein DNA-gebundener transkriptioneller Repressor von proneuralen Genen, der wenigstens zwei Transkriptionscofaktoren rekrutiert: Groucho und CtBP (Paroush et al., 1994; Poortinga et al., 1998). Groucho interagiert auch mit Histondeacetylasen, was vermuten läßt, daß Hairy-vermittelte Repression ebenfalls zum Teil durch die Etablierung einer repressiven Chromatinstruktur funktioniert

(Chen et al., 1999). Auch hier scheint die Art der Repression wiederum vom Kontext abhängig zu sein.

4.3 Analyse der peripheren Gliazellen im Wildtyp

Die peripheren Gliazellen sind einer der Hauptbestandteile des PNS von *Drosophila*. Über einfache Methoden können diese Zellen nucleär oder cytoplasmatisch markiert werden. Dadurch kann die Migration der peripheren Gliazellen leicht verfolgt und detailliert beschrieben werden. Es ist möglich, über z.B. eine gezielte GFP Expression den Weg der Zellen *in vivo* zu verfolgen. Nachdem ein solcher Migrationsprozeß im Wildtyp charakterisiert worden ist, können mittels der gleichen Methoden Mutanten analysiert werden.

Periphere Gliazellen verfolgen einen hoch stereotypen Weg der Migration und ihre Anzahl entlang der Hauptaxontrakte des PNS ist streng kontrolliert. Gene, die diese Prozesse regulieren, sind bis jetzt nicht beschrieben worden. Die Migration der peripheren Gliazellen ist begrenzt auf eine kurze Zeitspanne während der Embryogenese. Im frühen Stadium 12 fungieren die Gliazellen zunächst als Substrat für das auswachsende Pionieraxon, umgekehrt scheinen später die Axone das Substrat der Migration der Gliazellen zu sein (Sepp et al., 2000). Die regelmäßigen Abstände der Gliazellen nach erfolgter Migration deuten darauf hin, daß es eine Art von Sortierungsmechanismus geben muß, der einhergeht mit der terminalen Differenzierung dieser Zellen – dem Umhüllen der Axone. Durch cytoplasmatische Markierung einiger peripherer Gliazellen konnten ihre Zellfortsätze im konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht werden. Dies kann eine elektronenmikroskopische Analyse nicht ersetzen, ist aber eine Möglichkeit, um viele Mutationen schnell sichten zu können.

4.4 EMS Mutagenese zur Isolierung von Mutationen, die Defekte in der Migration der peripheren Gliazellen aufweisen

4.4.1 Der methodische Ansatz

Die stereotype Art der Entstehung und Migration der peripheren Gliazellen von *Drosophila* ist Grundvoraussetzung für diesen Ansatz. Die Markierung eines Subsets der Nuclei *J29* positiver Gliazellen erlaubt die Identifizierung dieser und so auch die Bestimmung fehlpositionierter Gliazellen. Somit können Genfunktionen aufgedeckt werden, die eine Rolle während der Migration der peripheren Gliazellen besitzen. Nach Durchführung einer EMS Mutagenese wurden mehr als 2.400 Stämme mit wenigstens einem letalen Treffer auf dem X-Chromosom analysiert. Außerdem wurde eine Sammlung drittchromosomaler Mutationen auf Defekte in der Entwicklung der peripheren Gliazellen untersucht (Hummel, 1998). Alle Mutationen waren über dominant markierte Chromosomen balanciert, was die direkte Identifizierung mutanter Embryonen erlaubt.

Stämme, die gesuchte Defekte aufwiesen, konnten im folgenden phänotypisch weiter analysiert werden. Die Markierung der Neurone des PNS durch den anti-Futsch Antikörper ermöglicht die Analyse der Projektion der Hauptaxontrakte sowie die Identifizierung der Anzahl und Positionierung der sensorischen Gruppen. Die Kommissuren des ZNS entwickeln sich in einer direkten Interaktion mit den Zellen der ventralen Mittellinie. Da eine abnorme Migration oder Differenzierung der Mittelliniengliazellen in einem Phänotyp fusionierter Kommissuren resultiert, wurde auch die axonale Organisation des ZNS mittels des mAb BP102 in den hier isolierten Mutationen auf derartige Defekte untersucht.

4.4.2 Das Spektrum der erhaltenen Phänotypen

Die Analyse von Mutanten und Identifizierung von Genen bedeutet nicht nur Erkenntnisse über die einzelnen Moleküle, die die Migration kontrollieren. Die Kategorien der unterschiedlichen Phänotypen erlauben ihrerseits Rückschlüsse auf den Migrationsprozeß. Aus der X-chromosomalen Mutagenese gingen 29 Stämme hervor, die Defekte in Anzahl und Position der verschiedenen peripheren Gliazellen

aufweisen. Dies entspricht nur ca. 1, 2 % der etablierten letalen Stämme. In einem von T. Hummel durchgeführten Screen führten dagegen 5,7 % der Letalmutationen zu den dort gesuchten, axonalen Phänotypen (Hummel, 1998). Diese beiden unterschiedlichen Screens sind jedoch nicht miteinander zu vergleichen, da die analysierten Prozesse sehr unterschiedlich sind. In dieser Arbeit wurde nur die Position dreier Nuclei pro Segment beurteilt im Gegensatz zur kompletten axonalen Gesamtorganisation des ZNS. Eine Abschätzung der Migrationsphänotypen gestaltet sich dagegen schwieriger, da wenig penetrante Phänotypen leicht übersehen werden können. Vergleichbare genetische Ansätze wurden bis jetzt nicht veröffentlicht.

4.4.2.1 Zellzahländerung und Fehlmigration der peripheren Gliazellen

In den meisten Mutanten, die mehr Gliazellen besitzen, sind die zusätzlichen Zellen zwischen den wildtypischen Positionen der Zellen angeordnet. Dies deutet darauf hin, daß die Position einer Zelle nicht festgelegt ist. Es wurden zwei Mutationen, *II-25E4* und *I-13H2* identifiziert, die zu einer Duplikation einer bestimmten Gliazelle führen. Dieses Ergebnis impliziert, daß das Zellschicksal determiniert sein kann. In der Mutante *XIII-21E3* sind weniger Gliazellen zu beobachten. Hier könnte ein Gen getroffen sein, welches für die korrekte Determination glialen Zellschicksals oder Zellteilung erforderlich ist. Genauere Analysen dieser Phänotypen mittels anderer glialer und neuronaler Marker stehen jedoch noch aus. In 19 der mutanten Stämme wurde keine von Wildtyp divergierende Anzahl der *J29* positiven peripheren Gliazellen gefunden.

Folgende, phänotypische Klassen wurden für die Migrationsdefekte gefunden: unregelmäßige (14 Mutanten), reduzierte (10 Mutanten) und erhöhte Migration (4 Mutanten). Die Klasse der Phänotypen, in denen die Gliazellen unregelmäßig migrieren, umfaßt mit 14 Mutanten die meisten Mitglieder. Es gibt weniger Beispiele, in denen die Zellen gar nicht oder zu weit in der Peripherie lokalisiert sind. Der Phänotyp unregelmäßiger Migration läßt schließen, daß diese Gene entweder spezifische (Zeit-)Abschnitte der Migration kontrollieren oder teils redundante Funktionen besitzen.

Die Klasse der Phänotypen, in denen die Gliazellen eine zu weite Strecke zurücklegen, ist schwierig zu beurteilen. Diese Phänotypen sind nicht sehr penetrant ausgeprägt und betreffen in den meisten Fällen die ventrale periphere Gliazelle oder/und die am ZNS Ausgang lokalisierte *J29* positive Gliazelle. In keinem Fall wurden Phänotypen gefunden, in denen alle der markierten Gliazellen zu weit in der Peripherie lokalisiert waren. Besonders in der zuletzt beschriebenen Klasse der Phänotypen ist es wichtig, in weiteren Analysen die Verteilung aller peripheren Gliazellen in Relation zu den *J29* positiven zu analysieren. Die abnorme Positionierung einer *J29* positiven Zelle bei annähernd wildtypischer Verteilung der übrigen Gliazellen würde bedeuten, daß die Positionierung einzelner Zellen bestimmt sein kann.

4.4.2.2 Neuronale PNS Organisation in Mutanten mit Migrationsdefekten der peripheren Gliazellen

Die Analyse der Defekte der isolierten Mutationen ergab ein weites Spektrum an Phänotypen. Reziprok trophische Beziehungen zwischen Axonen und Gliazellen im embryonalen PNS wurden über Ablationsstudien mittels des UAS/GAL4 Systems bereits nachgewiesen (Sepp and Auld, 2003a; Sepp et al., 2001). Die Ablation von Neuronen scheint z.B. in einem Verlust von Gliazellen zu resultieren. Umgekehrt verursacht die Ablation von Gliazellen den Verlust sensorischer Neurone. Die Analyse der axonalen Wegfindung in *glial cells missing* mutanten Embryonen zeigt, daß die Motoraxone des Segmental- und Intersegmentalnervs aberrant parallel projizieren und sich nicht am ZNS Ausgang treffen (Sepp et al., 2001; Takizawa and Hotta, 2001). Dennoch vermögen diese, später die Zielmuskeln zu finden. Viele der Phänotypen, in denen die Gliazellen nicht oder wenig migrieren, weisen diesen axonalen Phänotyp auf. Zudem sind in diesen Segmenten die Gliazellnuclei oft zwischen Segmental- und Intersegmentalnerv angeordnet. Beispiele für diese Defekte sind in *tango* und *crooked neck* Mutanten sowie in *VII-19H5*, *XIII-15C8* und *XII-8E1* Mutanten zu beobachten. Hier könnten frühe Migrationsprozesse betroffen sein, in denen u.a. die Funktion der peripheren Gliazellen als Wegsignal für die Projektion der ersten Pionieraxone gestört ist. Dies könnte sekundär bedingen, daß die folgenden Gliazellen, die sich anhand der axonalen Trakte orientieren, ihrerseits fehlpositioniert sind.

Es konnte gezeigt werden, daß durch Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der Rho I GTPase in den peripheren Gliazellen die Migration der peripheren Gliazellen terminiert werden kann. Auch die cytoplasmatischen Ausläufer der Zellen werden nicht gebildet (Sepp and Auld, 2003a). In diesen Embryonen projizieren die axonalen Trakte annähernd normal, sind jedoch in weiten Bereichen defaszikuliert. Diese Defaszikulationsdefekte wurden auch in den charakterisierten Embryonen beobachtet und korrelierten in den meisten Fällen mit dem Fehlen der Gliazellen in diesen Bereichen, wie in den Mutanten *XIII-21E3*, *XII-8E1*, *XII-13D1* und *VII-17G8* zu sehen ist. Es existieren aber auch mutante Embryonen, in denen die Position des Gliazellnucleus innerhalb der Faszikel selbst der Grund für die Defaszikulationsdefekte zu sein scheint. Dies wurde in der Mutante *6-16E3* beobachtet. In dem Spektrum der beobachteten, neuronalen Phänotypen wurde z.B. in *XIII-15C8* und *crooked neck* mutanten Embryonen neben Defaszikulationsdefekten der Verlust von Neuronen und Fehlprojektionen sensorischer Axone identifiziert. Hier könnte der Funktionsverlust der betreffenden Gene nicht nur die Migration betreffen, sondern auch die Interaktion von Neuronen und Glia. Ähnliche Phänotypen wurden nach Überexpression einer dominant Negativ wirkenden Variante von Ras I in peripheren Gliazellen gezeigt (Sepp and Auld, 2003a).

Die Analyse der axonalen ZNS Organisation in den X-chromosomalen Mutanten gab Aufschluß über Differenzierungsdefekte der Mittelliniengliazellen oder longitudinalen Gliazellen. So weisen einige der Mutanten (z.B. *1-23H6*, *XII-13D1*, *2-23D1* und *6-16E3*) fusionierte oder defaszikulierte Kommissuren auf, indikativ für einen Defekt der Differenzierung oder Migration der Mittelliniengliazellen. Andere Mutanten, z.B. $N^{\beta-8X}$ oder *XIII-21E3* zeigen Brüche oder verdünnte Konnektive (*XIII-15C8* oder *crn* Mutanten). Auch in *glial cells missing* mutanten Embryonen weisen die Konnektive in einigen Segmenten Brüche auf (Takizawa and Hotta, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, daß auch die korrekte Migration der longitudinalen Gliazellen für die Etablierung der longitudinalen ZNS Trakte erforderlich ist (Hidalgo and Booth, 2000; Jacobs, 1993; Kinrade et al., 2001). Die weitere Analyse der Mutanten wird durch diese Untersuchung der neuronalen Phänotypen vereinfacht. Mutanten, in denen das neuronale Muster hinweisend auf gliale Defekte ist, können

im Umkehrschluß von solchen unterschieden werden, in denen es wahrscheinlich ist, daß sekundäre Defekte den Gliamigrationsphänotyp mitbedingen.

4.5 Migration der Retinobasalgliazellen in der Augenimaginalscheibe

Ein Beispiel glialer Migration einiger Mammalia geschieht während der retinalen Entwicklung. Die Müllerschen Gliazellen werden durch das retinale Epithel generiert und sind gleichförmig über die Retina verteilt. Sie schicken ihre Fortsätze in die inneren und äußeren begrenzenden Schichten der Retina. Astrocyten migrieren, vom Epithel des optischen Nervs aus kommend, in die Retina hinein (Watanabe and Raff, 1988). Astrocytenfortsätze zeigen eine hohe Affinität für die Schicht der Fasern des optischen Nervs (Bussow, 1980; Stone and Dreher, 1987; Watanabe and Raff, 1988). Für *Drosophila* wurde gezeigt, daß die Retinobasalglia (RBG) analog als Immigrant außerhalb der Retina entlang des optischen Stiels auf der basalen Oberfläche des Augenscheibenepithels in die sich entwickelnde Augenimaginalscheibe einwandert. Die spezifische Assoziation der Gliazellen mit den Nervenfasern als auch das Migrationsverhalten lassen auf astrocytenähnliche Charakteristika und reziproke Neuron-Glia Interaktionen schließen (Choi and Benzer, 1994; Rangarajan et al., 1999).

Um zu untersuchen, ob den identifizierten Mutationen eine generelle Relevanz in glialen Migrationsprozessen zugrunde liegt, wurde in klonalen Analysen die Migration von RBG während der Larvalentwicklung von *Drosophila* untersucht. In Augenimaginalscheiben zweiter oder früher dritter Larvenstadien, in denen sich noch keine Photorezeptorvorläufer formieren, sind im Stiel zwei große Gliazellen zu finden. Später (ab beginnendem dritten Larvalstadium) wird die Population an RBG im Stiel immer größer. Diese Zahl steigt weiter mit wachsender Anzahl sich differenzierender Photorezeptoren. In späten Stadien mit ca. 20 Reihen von Photorezeptoren, können bis zu 100 RBG in der Augenimaginalscheibe gezählt werden. Der Fortsatz einer Gliazelle kann zehn Axone umhüllen. Die Migrationsfront der RBG schließt nicht mit der morphogenetischen Furche auf, sondern respektiert eine Grenze von etwa drei bis vier Photorezeptorzellreihen dahinter, korrelierend zum axonalen Auswachsen (Choi and Benzer, 1994; Hummel et al., 2002). BrdU Experimente zeigen, daß RBG Vorläuferzellen im Gehirn generiert werden und in

den optischen Stiel wandern. Die RBG entstehen unabhängig von der Differenzierung der Photorezeptoren (Choi and Benzer, 1994).

Die Migration der RBG in die Augenimaginalscheibe erlaubt eine einfache klonale Analyse glialer Migration. Von vielen der im Screen isolierten Mutationen konnten erste klonale Analysen durchgeführt werden, um „neuronal“ Gene zu finden, die die Migration steuern. Auch wurden in dieser Arbeit durch das MARCM System dominant markierte Klone wildtypischer RBG generiert. Diese Art der Markierung ermöglicht eine so bisher nicht beschriebene, detaillierte Darstellung der Fortsätze der RBG.

4.5.1 Analyse der wildtypischen Morphologie der Retinobasalgliazellen durch das MARCM System

Rangarajan et al. haben gezeigt, daß RBG ohne das Vorhandensein von Axonen im optischen Stiel in die Augenimaginalscheibe einwandern können, dennoch muß ein gewisser Differenzierungsgrad von Photorezeptoren vorhanden sein (Choi and Benzer, 1994; Rangarajan et al., 1999). Induktion ektopischer morphogenetischer Furchen mittels *decapentaplegic (dpp)*-exprimierender Zellen resultiert in Bereichen mit sich vorzeitig differenzierenden Photorezeptorclustern anterior der eigentlichen morphogenetischen Furche. RBG migrieren abhängig von der Größe und Distanz dieser Bereiche zur wildtypischen Migrationsfront in solche Bereiche ein. Diese Aufgabe könnte ein attraktives, diffusibles Signal, von den Rezeptoren ausgehend, erfüllen oder die RBG benutzen die gerade auswachsenden Axone als Substrat (Rangarajan et al., 1999). Die Analyse der MARCM Klone zeigt, daß die verschiedenen RBG extensive, feingliedrige Fortsätze aufweisen, die stets mit Axonen assoziiert sind, was auf ein haptotaktisches Signal schließen läßt.

Durch T. Hummel wurde aufgrund unterschiedlicher Markerexpression der RBG eine Kategorisierung dieser in die umhüllende Glia (wrapping glia) und Oberflächenglia (surface glia) durchgeführt. Die „umhüllende Glia“ befindet sich zwischen Rezeptoraxonen in der Augenimaginalscheibe und sendet lange Fortsätze in den optischen Stiel, dessen Axone sie umhüllt. Die „Oberflächenglia“ isoliert in der Augenimaginalscheibe die Photorezeptoraxone von der Hämolymphe (Hummel et

al., 2002). Durch die MARCM Analyse konnten diese Subtypen einzeln markiert werden. Die langen Fortsätze der „umhüllende Glia“ scheinen sich nicht nur im optischen Stiel zu befinden, sondern auch am Rand der Augenimaginalscheibe. Zudem konnten, ähnlich wie durch Rangarajan et al. beschrieben, „Übergangsformen“ zwischen beiden Typen, lokalisiert zwischen optischem Stiel und anteriorster Migrationsfront, beobachtet werden (Rangarajan et al., 2001). Neben diesen Gliazellen, die beide den RBG Marker Repo exprimieren, konnten mittels des MARCM Systems andere Zellpopulationen mit gliazellähnlicher Morphologie identifiziert werden.

Die Anzahl der analysierten MARCM Zellklone wildtypischer Augenimaginalscheiben war allerdings gering. Die hier angedeuteten Zelltypen müssen in größerer Anzahl weiter charakterisiert werden, um genaue Aussagen treffen zu können. Außerdem sollte es möglich sein, mit der Hilfe des MARCM Systems die Gliazellen sichtbar zu machen, die den Bolwig Nerv umhüllen, der apikal über die gesamte Augenantennenimaginalscheibe verläuft (Schmucker et al., 1997). Es ist davon auszugehen, daß dieser wichtige Nerv Gliazellen besitzt. Diese können bisher aber nicht durch Gliazellmarker identifiziert werden. Daher ist denkbar, daß es andere gliale Subpopulationen in der Augenimaginalscheibe gibt.

4.5.2 Analyse der RBG Migration *eyeless*-FLP induzierter Klone

Wird die Migration von RBG in die Augenimaginalscheibe verhindert, verfehlen die Photorezeptoraxone den optischen Stiel. Dies deutet darauf hin, daß Glia Photorezeptoraxone über lokale Kontakte in den Stiel leitet, da schon wenige Gliazellen im Stiel genügen, um Axone dorthin zu lenken (Rangarajan et al., 1999). Gliazellen stellen folglich unbekannte Richtungssignale, die die Axone in den Stiel leiten. Die anteriore Grenze von Photorezeptoren zur Glia ist streng kontrolliert. Wenn Glia richtungsweisend für Axone ist, birgt eine zu weite Migration die Gefahr, daß sich Axone an dieser Stelle nicht mehr posterior, sondern an dieser ektopischen Glia nach anterior orientieren (Hummel et al., 2002).

In *gilgamesh* (*gish*) mutanten Augenimaginalscheiben wandern RBG überwiegend in der dorsoventralen Mittellinie der Augenimaginalscheibe über die

morphogenetische Furche nach anterior hinaus. Diese Defekte sind schon vor dem dritten Larvalstadium zu beobachten; die Axone, die diesen ektopischen Gliazellen folgen, tun dies somit sekundär. Die Präferenz der RBG in der Mittellinie der Augenimaginalscheibe zu bleiben, ist vermutlich eine Konsequenz dieser frühen Fehlmigration, da die Expansion der RBG in die dorsale und ventrale Breite der Augenimaginalscheibe erst später erfolgt (Hummel et al., 2002). Dementsprechende Phänotypen wurden z.B. in den in dieser Arbeit analysierten *XII-14D1*, *N^{B-8X}* und *VIII-24E2* mutanten Klonen gefunden. Allerdings wurden nur Augenimaginalscheiben von Larven des dritten Larvalstadiums untersucht. Dennoch handelt es sich bei den gefundenen Defekten vermutlich um eben solche frühen Fehlmigrationen, da die ektopischen Gliazellen nur selten mit den klonalen Grenzen im Bereich der anterioren Migrationsfront korrelieren (s.u.).

Die neuronale Entwicklung in der Augenimaginalscheibe beginnt unter der Kontrolle eines Signalcenters am posterioren Ende (Dominguez and Hafen, 1997). In *hedgehog* (*hh*), *eyless* (*ey*) und *sine oculis* (*so*) Mutanten können *gish*-ähnliche frühe Gliamigrationsphänotypen beobachtet werden (Hummel et al., 2002). Die adulten Augenphänotypen dieser Augenspezifizierungsmutanten ähneln *gish* mutanten Tieren. Es kommt zu einem Verlust von Ommatidien in der anterioren Region. Dieser Verlust ist je nach Klongröße auch in den adulten Augen *N^{B-8X}* mutanter Tiere zu beobachten, die ebenfalls *gish* vergleichbare Migrationsdefekte der RBG aufweisen. Daher stellen die glialen Migrationsdefekte vermutlich eher sekundäre Defekte als Antwort auf frühe Spezifizierungsdefekte der Augenentwicklung dar.

Die klonalen Analysen der X-chromosomalen Mutanten sind noch unvollständig, und die erhaltenen Phänotypen können noch nicht klar voneinander abgegrenzt werden. Neben den zuvor beschriebenen Phänotypen aber treten z.B. in der Mutante *XII-14D1* Migrationsdefekte der RBG auf, die mit klonalen Bereichen an der anterioren Migrationsfront korrelieren. Wie erwähnt, muß die anteriore Migration der Gliazellen in Richtung der sich differenzierenden Photorezeptorcluster streng kontrolliert werden. Denkbar ist, daß hier Moleküle fehlen, die lokal in dem Bereich der Augenimaginalscheibe das Stoppsignal für die RBG darstellen. Es traten z.B. in der Mutante *VII-19H5* auch Phänotypen mit gliazellfreien Bereichen auf, die teils auch mutanten, klonalen Bereichen entsprechen. Die Gliazellen scheinen also diese

klonalen Regionen zu meiden. Abschließend kann festgehalten werden, daß durch diese ersten Analysen unterschiedliche RBG Fehlmigrationsphänotypen identifiziert wurden. Diese lassen auf eine generelle Funktion der entsprechenden Gene im Zusammenhang mit glialer Migration schließen. Um Gene zu identifizieren, die zellautonom in den RBG für die Migration oder Neuron-Gliainteraktionen nötig sind, kann in zukünftigen Experimenten das MARCM System verwendet werden.

4.6 Analyse der Mutationen *Notch*, *tango* und *crooked neck*

4.6.1 Die Funktion von *Notch* während der Migration der peripheren Gliazellen

Das Gen *Notch* codiert einen transmembranen Rezeptor, der lokale Zellkommunikation zwischen benachbarten Zellen vermittelt und eine Signalkaskade koordiniert, die in allen bisher untersuchten tierischen Spezies präsent ist. Notch Signalwege sind weit verbreitet und dienen dazu, Zellschicksale sowie Musterbildung zu determinieren. Der Funktionsverlust von Notch resultiert in einer enormen Vielfalt von Entwicklungsdefekten und adulten Pathologien (Kopan, 2002; Lai, 2004).

In dieser Arbeit konnte eine Funktion von *Notch* während der Migration der peripheren Gliazellen beschrieben werden. Zunächst wurde über die phänotypische Analyse der im Screen isolierten N^{B-8X} und N^{A-3E3} Mutanten ein Migrationsdefekt entdeckt. Die *J29* positiven Gliazellen migrieren unregelmäßig und sind an aberranten Positionen entlang der axonalen Trakte lokalisiert. N^{B-8X} mutante Embryonen weisen selten neuronale Hyperplasie auf, so daß der Migrationsphänotyp ohne das Vorhandensein zusätzlicher Neurone und ektopischer Gliazellen analysiert werden konnte. Das ZNS dieser Tiere weist dementsprechend andere Qualitäten axonaler Desorganisation auf: Die Konnektive zeigen Brüche, und die Kommissuren sind leicht fusioniert. Diese Phänotypen sind indikativ für eine Fehlmigration der lateralen Gliazellen und Mittelliniengliazellen. Eine genauere Analyse dieser Phänotypen steht jedoch noch aus. Mittels eines temperatursensitiven Allels wurde die *Notch* Funktion in definierten Zeitfenstern während der Embryogenese ausgeschaltet (Shellenbarger and Mohler, 1978). Die resultierenden Migrationsdefekte stellen Phänokopien der Defekte der im Screen

isolierten Mutanten dar. Daraus folgt, daß Notch die Migration der peripheren Gliazellen steuert.

Über ein Su(H) Konstrukt konnte gezeigt werden, daß Notch Signalwege in den peripheren Gliazellen aktiv sind. Zudem läßt die zeitliche Abfolge der Expression dieses Konstruktes sogar die Vermutung zu, daß diese Aktivität während der Migration der peripheren Gliazellen gebraucht wird. Nach Überexpression der intrazellulären Domäne von *Notch* in Gliazellen über den Aktivator *loco* GAL4 wurden frühlarvale Letalität, embryonale Migrationsdefekte der peripheren Gliazellen als auch axonale Defekte beobachtet. Die Expression der extrazellulären Domäne von *Notch*, die in einer *Notch* Signalreduktion resultiert, in nur einem Subset der peripheren Gliazellen resultiert in adulten Phänotypen. Die Fliegen können sich nur unkoordiniert bewegen. In *loco* Mutanten werden ähnliche Defekte und Defekte in der terminalen Differenzierung von Gliazellen beschrieben; die Axone werden nur unvollständig durch Gliazellen abgeschirmt (Granderath et al., 1999). Analog dazu könnten auch in *Notch* mutanten Embryonen ähnliche Defekte auftreten, was in zukünftigen Analysen untersucht werden muß. Innerhalb der Arbeit wurde begonnen, die Rolle von Delta als Ligand von Notch in dem Kontext der Migration der peripheren Gliazellen zu untersuchen. Überexpression von *Delta* in einem Subset der peripheren Gliazellen führt zu spätpupaler Letalität. Erste Analysen *Delta* mutanter Embryonen zeigten stark neurogene Defekte, so daß potentielle Migrationsdefekte nicht bestimmt werden konnten. Die weitere phänotypische Analyse steht daher noch aus.

Bisher gibt es wenig Hinweise auf eine Funktion von Notch während Migrationsprozessen. Der Verlust von Delta-1 in Mäusen verursacht Defekte in der Migration der Neuralleistenzellen (De Bellard et al., 2002). Kuzbanian (Kuz), ein Mitglied der ADAM (a disintegrin and metalloprotease) Familie der Metalloproteasen, einer der Hauptkomponenten des Notch Signalwegs, scheint in den Migrationsprozeß der border cell Migration (vgl. Abb.3) involviert zu sein (X. Wang et al. Posterpräsentation im Rahmen der *Drosophila* Research Conference Washington 2004 mit dem Titel: *Kuzbanian, a key regulator of the Notch signaling pathway, is essential for border cell migration in the Drosophila ovary*).

4.6.2 Analyse des Gens *tango*

Das Gen *tango* codiert einen bHLH-PAS Transkriptionsfaktor, welcher mit anderen bHLH-PAS Transkriptionsfaktoren heterodimerisiert. Proteine mit PAS Domänen besitzen eine Fülle unterschiedlicher Funktionen einschließlich Liganden- und Protein-Protein Interaktionen (Crews and Fan, 1999). *Drosophila* Tango ist ein Ortholog des Arnt Proteins (aryl hydrocarbon nuclear translocator receptor) der Mammalia und wird daher auch als *Drosophila* Arnt bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst aus einer Kollektion drittchromosomaler Mutanten zwei bis dato dem *jaywalker* Locus zugeordnete Mutationen phänotypisch analysiert. In mutanten Embryonen der beiden Stämme können Defekte in der Gliamigration beobachtet werden: Die peripheren Gliazellen migrieren unregelmäßig. Segmental- und Intersegmentalnerv projizieren oft parallel, und die Gliazellnuclei sind häufig in den dadurch entstehenden Lücken lokalisiert. Komplementationstests und phänotypische Analysen des trachealen Phänotyps *jaywalker* mutanter Embryonen ergaben, daß *jaywalker* allelisch zu *tango* ist.

Die Überexpression eines dominant Negativs zur Tango Funktion in lateralen Gliazellen mittels des Aktivators *loco* GAL4 resultiert in frühlarvaler Letalität und embryonalen Migrationsdefekten der peripheren Gliazellen. Vergleichbar mit *tango* mutanten Embryonen sind die peripheren Gliazellen unregelmäßig entlang der axonalen Trakte lokalisiert. Der *loco* GAL4 Aktivator induziert jedoch auch Expression in den Tracheen. Hier führt der Ausfall von *tango* ebenfalls zu embryonaler Letalität. Weiterhin ist es möglich, daß Tracheen ebenfalls ein Substrat der Migration peripherer Gliazellen darstellen können. Die Fehlmigration der peripheren Gliazellen in *tango* mutanten Embryonen wäre somit ein sekundärer Defekt. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das primäre Substrat der Migration der peripheren Gliazellen die Axone des PNS darstellen. In *breathless* mutanten Embryonen, in denen das Tracheensystem stark reduziert ist, wurden zudem keine Migrationsphänotypen der peripheren Gliazellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). In zukünftigen Analysen sollten weitere Mutanten, wie z.B. *trachealess*, ebenfalls untersucht werden, um Tracheen als Migrationssubstrat für die Migration der peripheren Gliazellen ausschließen zu können.

Tango kann mit spezifisch exprimierten, weiteren bHLH-PAS Transkriptionsfaktoren heterodimerisieren (Crews and Fan, 1999). Anders als das Mammalia Homolog scheint Tango keine Homodimere formieren zu können (Sonnenfeld et al., 1997). Es sind in *Drosophila* viele Entwicklungsprozesse beschrieben worden, die unter der Kontrolle von Heterodimeren stehen, bei denen einer der Partner das Tango Protein ist (Crews, 1998; Crews and Fan, 1999). Tango ist cytoplasmatisch relativ ubiquitär und in einigen Geweben nucleär lokalisiert (Ward et al., 1998).

Die bisherigen Ergebnisse unterstützen ein Modell, in dem Tango im Cytoplasma solcher Zellen lokalisiert ist, in denen keine (oder nur in geringen Mengen) bHLH-PAS Dimerisierungspartner vorhanden sind. Sind diese vorhanden, passiert Dimerisation und der Komplex transloziert in den Nucleus (Ward et al., 1998). Auf der anderen Seite ist damit die Frage nach der Funktion des cytoplasmatischen Tangoanteils nicht geklärt. In den peripheren Gliazellen ist das Tango Protein nicht nucleär akkumuliert, so daß hier auf eine hauptsächlich cytoplasmatische Interaktion von Tango mit möglichen anderen bHLH-PAS Proteinen geschlossen werden kann.

In der weiteren Analyse wurde nach möglichen Interaktionspartnern von Tango im Kontext der Migration der peripheren Gliazellen gesucht. Mittels *in situ* mRNA Hybridisierungen als auch durch die Proteinexpressionen möglicher Kandidaten wurden solche Gene gesucht, die entweder in den peripheren Gliazellen oder in dem Substrat der Migration, in Neuronen, exprimiert werden. Weiter wurde die Klonierung von sog. Snapback RNAi Konstrukten begonnen. Diese ermöglichen das Ausschalten von Genfunktionen in spezifischen Geweben. Funktionsverlust des Interaktionspartners sollte wie in *tango* mutanten Embryonen in vergleichbaren Migrationsdefekten resultieren. mRNA Expression der untersuchten bHLH-PAS codierenden Gene in peripheren Gliazellen konnte bisher nicht detektiert werden. Die vorläufige RNAi Analyse ergab, daß bei Expression des *germ cell-expressed (gce)* RNAi Konstruktes über den Aktivator *loco* GAL4 frühlarvale Letalität induziert wird. Ein embryonaler Migrationsphänotyp konnte allerdings in diesen Tieren nicht identifiziert werden. Um den Interaktionspartner bestimmen zu können, sind noch

weitere Experimente notwendig. Neben der RNAi Analyse können in Zukunft zusätzlich die Defizienzen der Exelixis und DrosDel Kollektionen (<http://www.exelixis.com> (Artavanis-Tsakonas, 2004) <http://www.drosdel.org.uk>) benutzt werden, um Mutanten der möglichen Interaktionspartner phänotypisch analysieren zu können. Die Suche nach den Interaktionspartnern sollte eventuell auch auf solche Proteine erweitert werden, die nur die PAS Domäne besitzen.

4.6.3 Analyse des Gens *crooked neck*

Das *Drosophila crooked neck (crn)* Gen codiert ein TPR-(*tetratricopeptide repeats*) enthaltendes Protein, welches essentiell für die embryonale Entwicklung von *Drosophila* ist (Zhang et al., 1991). Mutationen im Gen sind embryonal letal und führen zu deutlichen Defekten während der Muskel-, Darm- und ZNS/PNS-Entwicklung (Drysdale, 1993; Zhang et al., 1991). Im PNS fehlen spezifische Neurone, die sich normalerweise spät während der Embryogenese entwickeln während die frühe Neurogenese ungestört erscheint (Zhang et al., 1991). Periphere Gliazellen zeigen starke Migrationsdefekte; die Glia migriert nicht mehr, sondern verbleibt an der ZNS/PNS Grenze.

4.6.3.1 Phänotypische Analyse der *crooked neck* Mutanten

Die in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen von *crooked neck* Mutanten umfassen die embryonale ZNS und PNS Organisation, die Muskulatur und die Lokalisation und strukturellen Defekte der peripheren Gliazellen. Die neuronalen Strukturen der *crn* Mutanten weisen unterschiedliche Phänotypen auf. Das ZNS und PNS mutanter *crn^{III-26H8}* Embryonen ist durch eine Desorganisation und deutlich reduzierte Neuronenzahl charakterisiert. *crn^{IX-15H6}* mutante Embryonen zeigen neuronale Defekte, die auf gliale Entwicklungs- oder/und Migrationsdefekte deuten.

Die Nuclei der peripheren Gliazellen verbleiben in *crn* Mutanten fast unmittelbar an ihrem Entstehungsort. Mittels konfokaler Mikroskopie und der EM Analyse konnte dargestellt werden, daß die peripheren Gliazellen in *crn^{IX-15H6}* mutanten Embryonen die axonalen Trakte des PNS nicht umhüllen. Es sind dennoch

lange Zellfortsätze der Gliazellen zu erkennen, die entlang der Axone lokalisiert aber nicht immer direkt mit ihnen assoziiert sind. Die Analyse dieses Phänotyps erlaubt erstmalig Rückschlüsse auf den Prozeß der Umhüllung der Axone durch die peripheren Gliazellen. Es ist anzunehmen, daß die Gliazelle zuerst Fortsätze entlang eines Bereichs der Axons schickt und dann beginnt, die Axone seitlich zu umhüllen. Untersuchungen, die eine Funktion von Crn in den peripheren Gliazellen belegen können, wie z.B. durch eine zellspezifische Rettung des glialen Phänotyps, stehen noch aus.

Die klonale Analyse von *crooked neck* deutet auf eine zellautonome Funktion. Allerdings ist die Zahl der bisher untersuchten, mit Hilfe des MARCM Systems markierten Klone noch zu gering, um eine abschließende Aussage zu treffen.

4.6.3.2 Die Crooked neck Proteinstruktur

Das Crn Protein besteht aus 16 variierenden Kopien des *tetratricopeptide repeats* (TPR). TPRs umfassen 34 Aminosäuren und sind generell tandemartig wiederholt innerhalb einer einzigen Polypeptidkette. Sequenzvergleiche ergaben acht konservierte Positionen innerhalb der 34 aa, die alle auf der gleichen Seite putativer amphipatischer α -Helices positioniert sind (Das et al., 1998). Die TPR repeats formieren Gerüste, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln und oft am Aufbau von Multiproteinkomplexen beteiligt sind (Das et al., 1998). Beispiele identifizierter, TPR-enthaltender Proteinkomplexe sind: der mitochondriale und peroxisomale Importrezeptorkomplex, der *anaphase promoting complex* (APC), der SSN6/CYC8 Transkriptionsrepressionskomplex und prä-mRNA spleißende Komplexe. Aus der letztgenannten Beispielgruppe wurde Clf1 mit 40%iger Identität als das am nächsten Verwandte zum *Drosophila* Crn determiniert (Raisin-Tani and Leopold, 2002). Weitere bisher beschriebene *Drosophila* Proteine, die multiple TPR repeats enthalten, sind Partner of inscuteable (Pins) und Activator of G-Protein Signaling 3 (AGS3) (Blumer et al., 2003; Yu et al., 2002). S. Raisin-Tani et al. konnten zeigen, daß das Crn Protein Teil eines nucleären Multiproteinkomplexes und assoziiert mit snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) ist. So könnte Crn in der Zusammenstellung von Spleißkomplexen mitwirken (Raisin-Tani and Leopold, 2002).

Durch die Sequenzanalyse zweier in dieser Arbeit generierten *crn* Allele konnte in beiden Fällen Basenaustausche, die in Stop Codons resultieren, identifiziert werden. Im *crn^{IX-15H6}* Allel wird dadurch das Gen an Position 1855 trunziert, unmittelbar bevor dem nucleären Lokalisationssignal. Das *crn^{II-26H8}* Allel weist ein Stop Codon an Position 1171 auf, im neunten der 16 TPR repeats. Die phänotypische Analyse läßt bei beiden Allelen auf einen hypomorphen Charakter schließen. Mutanten des *crn^{II-26H8}* Stammes weisen jedoch generell stärkere Defekte als die *crn^{IX-15H6}* mutanter Embryonen auf, was darauf schließen läßt, daß die unterschiedlichen TPR repeats auch unterschiedliche Funktionen besitzen.

4.6.3.3 *crn* mRNA und Crn Proteinlokalisierung

Das *crn* mRNA Expressionsmuster im Embryo zeigt eine maternale Komponente. Während der Mesoderminvagination exprimieren die Zellen des Mesoderms und die Primordien des anterioren und posterioren Mitteldarms das Transkript. Die *crooked neck* mRNA ist im Embryo ab der Gastrulation bis zum Ende der Embryogenese ubiquitär exprimiert. Auch in Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums scheint das Transkript ubiquitär lokalisiert zu sein.

Polyklonale Antikörper erkennen im Western eine Bande von 88kDa. Immunolokalisationsexperimente an Embryonen zeigen ubiquitäre Verteilung des Proteins sowohl bezogen auf die diversen Gewebetypen als auch auf die verschiedenen Stadien der Embryogenese (Raisin-Tani and Leopold, 2002). Subzellulär ist das Protein im Nucleus zu finden, in distinkten „speckles“ (Flecken), die schon als Speicher für die meisten Spleißfaktoren und einiger Transkriptionenzyme beschrieben worden sind (Raisin-Tani and Leopold, 2002). Mittels des von P. Léopold erhaltenen polyklonalen Antikörpers wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Lokalisationstudien durchgeführt. Nach ekotopischer Expression von Crooked neck mittels des UAS/GAL4 Systems, konnte das Protein nicht nur nucleär, sondern auch cytoplasmatisch nachgewiesen werden. Die subzelluläre Verteilung des endogenen Proteins wurde zudem in S2 Zellen untersucht. Dort scheint das Protein ebenfalls cytoplasmatisch und nucleär lokalisiert zu sein. Diese Aussagen decken sich auch mit der Verteilung des Humanen Crn Homologs in HeLa Zellen, in denen u.a. ein „diffuses, cytoplasmatisches Signal“ mit

unbekannter Funktion beschrieben wird (Chung et al., 2002). Weitere Analysen mittels eines neuen Antikörpers und RNAi Experimenten stehen jedoch noch aus.

4.6.3.4 Held out wings – ein möglicher Interaktionspartner von Crooked neck

In einer Kooperation mit dem Labor von T.Volk (Israel) wird gegenwärtig untersucht, ob Crooked neck ein Interaktionspartner von Held out wings (How) sein kann. *held out wings (how)* codiert ein RNA bindendes Protein, welches in zwei Isoformen, How (small/S) und How (long/L) auftritt, die sich nur durch ihren C-Terminus unterscheiden. *crn* mutante Embryonen weisen mit *how* mutanten Embryonen vergleichbare Muskeldefekte auf und für How konnte gezeigt werden, daß es in den peripheren Gliazellen lokalisiert ist (T.Volk, persönliche Mitteilung). Die phänotypische Analyse ergab, daß die peripheren Gliazellen in *how* mutanten Embryonen nicht weit genug in der Peripherie lokalisiert sind. Ferner weisen *how* und *crn* mutante Embryonen vergleichbare neuronale PNS Defekte auf.

How (L) besitzt ein nucleäres Retentionssignal, während How (S) Expression sowohl im Nucleus als auch im Cytoplasma zu finden ist. How (L) ist in Muskelansatzstellen (tendon cells) dafür verantwortlich, eine verfrühte Reifung dieser zu verhindern, indem es *stripe* mRNA Level reprimiert (Nabel-Rosen et al., 1999). How (S) aber hebt die *stripe* mRNA Level an. Diese Aktivität wird durch die 3'UTR von *stripe* vermittelt. Bei Coexpression von How (S) und How (L) wirkt How (S) direkt der How(L) Repression entgegen. So haben beide Isoformen entgegengesetzte Funktionen, die Stabilisierung bzw. Repression der *stripe* mRNA betreffend. Sie stellen eine Art Schalter zwischen Differenzierung und Reifung der Muskelansatzstellen dar (Nabel-Rosen et al., 2002).

Co-Immunopräzipitationen von How Proteinen und anschließende Western Blot Analysen ergeben bis jetzt folgendes Bild: Crn und How (S) scheinen im Cytoplasma von Zellen miteinander zu interagieren. Dies trifft auch für eine mutierte, daher im Cytoplasma lokalisierte, Form von How (L) zu (T.Volk, persönliche Mitteilung). Es kann spekuliert werden, daß der cytoplasmatische Anteil des Crn Proteins für den Transport von How (S) in den Nucleus verantwortlich ist. In *Drosophila* wurde bereits für Partner of Inscuteable (Pins) beschrieben, daß die

unterschiedlichen TPR repeats dieses Proteins teils für eine apikale Lokalisation und/oder die Rekrutierung von Inscuteable (Insc) in den apikalen Cortex verantwortlich sind (Yu et al., 2002). Weitere Analysen der Interaktion von Crn und How Proteinen stehen noch aus. Interessanterweise ist für das Vertebratenhomolog von How, Quaking, ein glialer Phänotyp beschrieben worden (Nabel-Rosen et al., 2002).

5 Zusammenfassung

Ein funktionales Nervensystem erfordert eine enge Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen. Die Migration und Differenzierung der Gliazellen wurde in der vorliegenden Arbeit mit lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Auflösungen dokumentiert.

Um ein weiteres Verständnis dieser zellulären Interaktionen zu erhalten, ist eine genetische Analyse notwendig. Es wurde zunächst versucht, ein induzierbares Geninaktivierungssystem zu etablieren. In Vorarbeiten erwies sich die BTB Domäne des Tramtrack Proteins als transkriptionelle Repressionsdomäne. Die Kopplung dieser Domäne an die DNA-Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors Pointed bewirkte die Generierung eines dominant negativ wirkenden Transkriptionsfaktors. In Analogie zu diesen Ergebnissen wurde versucht, die DNA-bindende Domäne des GAL4 Proteins mit der BTB Domäne zu kombinieren. Es wurden verschiedene Konstrukte erstellt, aber es konnte kein dominant negativer GAL4 Transkriptionsfaktor generiert werden.

Um Gene zu identifizieren, die die Neuron-Glia Interaktion im PNS des *Drosophila* Embryos kontrollieren, wurde eine „klassische“ EMS Mutagenese für das X-Chromosom durchgeführt. Aus 12.000 etablierten Stämmen wurden ca. 2.400 letale Stämme selektioniert und auf Defekte in der Migration der peripheren Gliazellen untersucht. Weiterhin wurden ca. 400 vorselektionierte drittsomomale Mutationen analysiert. Die Phänotypen der 31 gefundenen Mutanten wurden weiter charakterisiert und in unterschiedliche Klassen eingeteilt.

Zwei Allele des *Notch* Locus wurden isoliert, die zu einer abnormen Migration der peripheren Gliazellen führen. *Notch* ist bislang nicht mit der Migrationskontrolle in Verbindung gebracht worden.

Die Gene *tango* und *crooked neck*, die ebenfalls für die korrekte Migration der peripheren Gliazellen benötigt werden, wurden auf molekularer Ebene weiter untersucht. Ferner wurde versucht, Interaktionspartner dieser Gene zu identifizieren.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, K. F., Engel, C. K. and Prive, G. G.** (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12123-8.
- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G. and Leprince, D.** (1995). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* **6**, 1193-8.
- Artavanis-Tsakonas, S.** (2004). Accessing the Exelixis collection. *Nat Genet* **36**, 207.
- 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.
- Badenhorst, P., Finch, J. and Travers, A.** (2002). Tramtrack co-operates to prevent inappropriate neural development in *Drosophila*. *Mech Dev* **117**, 87.
- Baehrecke, E. H.** (1997). who encodes a KH RNA binding protein that functions in muscle development. *Development* **124**, 1323-32.
- Bai, J., Uehara, Y. and Montell, D. J.** (2000). Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell* **103**, 1047-58.
- Baonza, A., Murawsky, C. M., Travers, A. A. and Freeman, M.** (2002). Pointed and Tramtrack69 establish an EGFR-dependent transcriptional switch to regulate mitosis. *Nat Cell Biol* **4**, 976-80.
- Bardwell, V. J. and Treisman, R.** (1994). The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Dev.* **8**, 1664-1677.
- Bate, M.** (1993). The Mesoderm and its Derivatives. In *Development of Drosophila*, vol. 2 (ed. C. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1013-1090: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H. J.** (1996). A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* **87**, 1059-68.
- 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.
- Blumer, J. B., Bernard, M. L., Peterson, Y. K., Nezu, J., Chung, P., Dunican, D. J., Knoblich, J. A. and Lanier, S. M.** (2003). Interaction of activator of G-protein signaling 3 (AGS3) with LKB1, a serine/threonine kinase involved in cell polarity and cell cycle progression: phosphorylation of the G-protein regulatory (GPR) motif as a regulatory mechanism for the interaction of GPR motifs with Gi alpha. *J Biol Chem* **278**, 23217-20.
- Bogdan, S. and Klambt, C.** (2003). Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* **130**, 4427-37.
- 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.
- 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.
- Bray, S. and Furriols, M.** (2001). Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. *Curr Biol* **11**, R217-21.
- Brody, T.** (1999). The Interactive Fly: gene networks, development and the Internet. *Trends Genet* **15**, 333-4.
- Brohier, H. T., Moore, L. A., Van Doren, M., Newman, S. and Lehmann, R.** (1998). zfh 1 is required for germ cell migration and gonadal mesoderm development in *Drosophila*. *Development* **125**, 655-66.
- 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.
- Brose, K. and Tessier-Lavigne, M.** (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 95-102.
- Brown, J. L. and Wu, C.** (1993). Repression of *Drosophila* pair-rule segmentation genes by ectopic expression of tramtrack. *Development* **117**, 45-58.
- Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C.** (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene domeless. *Curr Biol* **11**, 1700-5.
- 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.
- Bussow, H.** (1980). The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res* **206**, 367-78.
- 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. and Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A. J.** (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* **13**, 2218-30.
- Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S. and Hou, S. X.** (2002). mom identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev* **16**, 388-98.
- Choi, K. W. and Benzer, S.** (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* **12**, 423-31.
- Chung, S., Zhou, Z., Huddleston, K. A., Harrison, D. A., Reed, R., Coleman, T. A. and Rymond, B. C.** (2002). Crooked neck is a component of the human spliceosome and implicated in the splicing process. *Biochim Biophys Acta* **1576**, 287-97.
- Collins, T., Stone, J. R. and Williams, A. J.** (2001). All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol* **21**, 3609-15.
- Crews, S. T.** (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* **12**, 607-20.

- Crews, S. T. and Fan, C. M.** (1999). Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 580-7.
- Das, A. K., Cohen, P. W. and Barford, D.** (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J* **17**, 1192-9.
- De Bellard, M. E., Ching, W., Gossler, A. and Bronner-Fraser, M.** (2002). Disruption of segmental neural crest migration and ephrin expression in delta-1 null mice. *Dev Biol* **249**, 121-30.
- Deshpande, G., Swanhart, L., Chiang, P. and Schedl, P.** (2001). Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* **106**, 759-69.
- Dhordain, P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M. and Leprince, D.** (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10762-7.
- Dickson, B. J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-64.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Kopranner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T. and Raz, E.** (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* **111**, 647-59.
- Dominguez, M. and Hafen, E.** (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the Drosophila eye. *Genes Dev* **11**, 3254-64.
- Dong, R. and Jacobs, J. R.** (1997). Origin and differentiation of supernumerary midline glia in Drosophila embryos deficient for apoptosis. *Dev Biol* **190**, 165-77.
- Drysdale, R. A., Rushton, E., Bate, M.** (1993). Genes required for embryonic muscle development in Drosophila melanogaster: A survey of the X chromosome. *J Roux Arch. dev. Biol.* **202**, 276--295.
- Duchek, P. and Rorth, P.** (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis. *Science* **291**, 131-3.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S. and Rorth, P.** (2001). Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. *Cell* **107**, 17-26.
- Eberl, D. F. and Hilliker, A. J.** (1988). Characterization of X-linked recessive lethal mutations affecting embryonic morphogenesis in Drosophila melanogaster. *Genetics* **118**, 109-20.
- Edenfeld, G.** (1999). Untersuchung der Funktion von BTB-ETS Proteinchimären während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*. *Staatsexamensarbeit*.
- Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U. and Reichert, H.** (2002). Gliogenesis in Drosophila: genome-wide analysis of downstream genes of glial cells missing in the embryonic nervous system. *Development* **129**, 3295-309.
- 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.
- Emmons, R. B., Duncan, D., Estes, P. A., Kiefel, P., Mosher, J. T., Sonnenfeld, M., Ward, M. P., Duncan, I. and Crews, S. T.** (1999). The spineless-aristopedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in Drosophila. *Development* **126**, 3937-45.
- Englund, C., Steneberg, P., Falileeva, L., Xylourgidis, N. and Samakovlis, C.** (2002). Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the Drosophila trachea. *Development* **129**, 4941-51.

- 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.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. and Doe, C. Q.** (2003). Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**, 567-80.
- 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.
- Furriols, M. and Bray, S.** (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol* **11**, 60-4.
- Fuss, B., Josten, F., Feix, M. and Hoch, M.** (2004). Cell movements controlled by the Notch signalling cascade during foregut development in *Drosophila*. *Development* **131**, 1587-95.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B. Z. and Klämbt, C.** (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* **122**, 3355-62.
- Giesen, K.** (2000). Die *tramtrack*-Gengruppe - Negative Regulatoren zellulärer Differenzierung? *Dissertation*.
- 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.
- Giesen, K., Lammel, U., Langehans, D., Krukkert, K., Bunse, I. and Klämbt, C.** (2003). Regulation of glial cell number and differentiation by ecdysone and Fos signaling. *Mech Dev* **120**, 401-13.
- Giniger, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1993). Specifying the path of the intersegmental nerve of the *Drosophila* embryo: a role for Delta and Notch. *Development* **117**, 431-40.
- Godt, D. and Tepass, U.** (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin based adhesion. *Nature* **395**, 387-91.
- 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. and Klämbt, C.** (1999). Glia development in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 531-536.
- 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.
- Guo, M., Bier, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1995). *tramtrack* acts downstream of *numb* to specify distinct daughter cell fates during asymmetric cell divisions in the *Drosophila* PNS. *Neuron* **14**, 913-25.
- Guo, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* **17**, 27-41.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. and Krasnow, M. A.** (1998). *sprouty* encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* **92**, 253-63.
- 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.

- Hidalgo, A.** (2003). Neuron-glia interactions during axon guidance in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans* **31**, 50-5.
- 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.
- 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.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M. and Stein, E.** (1999). A ligand gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97**, 927-41.
- 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.
- Howard, K., Jaglarz, M., Zhang, N., Shah, J. and Warrior, R.** (1993). Migration of *Drosophila* germ cells: analysis using enhancer trap lines. *Dev Suppl*, 213-8.
- 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.** (1997). Fast and efficient egg collection and antibody staining from large numbers of *Drosophila* strains. *DEG* **207**, 131-135.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999a). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila* : I Identification of the required gene functions. *Dev. Biol.* **209**, 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.
- Huynh, K. D. and Bardwell, V. J.** (1998). The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT. *Oncogene* **17**, 2473-84.
- 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.
- 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.
- Jacobs, J. R.** (1993). Perturbed glial scaffold formation precedes axon tract malformation in *Drosophila* mutants. *J Neurobiol* **24**, 611-26.
- Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1989a). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* **9**, 2402-11.

- Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1989b). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J Neurosci* **9**, 2412-22.
- Jaglarz, M. K. and Howard, K. R.** (1995). The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* **121**, 3495-503.
- Jiang, L. and Crews, S. T.** (2003). The *Drosophila* dysfusion basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS gene controls tracheal fusion and levels of the trachealess bHLH-PAS protein. *Mol Cell Biol* **23**, 5625-37.
- 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.
- Jones, B. W.** (2001). Glial cell development in the *Drosophila* embryo. *Bioessays* **23**, 877-87.
- 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.
- Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L. A., Technau, G. M. and Dickson, B. J.** (2002). Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* **110**, 415-27.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R. and Tessier-Lavigne, M.** (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425-35.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (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.
- Klämbt, C.** (1993). The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**, 163-76.

- Klämbt, C.** (2000). EGF receptor signalling: the importance of presentation. *Curr Biol* **10**, R388-91.
- Klämbt, C., Glazer, L. and Shilo, B. Z.** (1992). breathless, a Drosophila FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* **6**, 1668-78.
- Klämbt, C. and Goodman, C. S.** (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo. *Glia* **4**, 205-13.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1991). The midline of the Drosophila central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**, 801-15.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R. and Nusslein-Volhard, C.** (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* **421**, 279-82.
- 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.
- Kopan, R.** (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci* **115**, 1095-7.
- Kunwar, P. S., Starz-Gaiano, M., Bainton, R. J., Heberlein, U. and Lehmann, R.** (2003). Tre1, a G Protein-Coupled Receptor, Directs Transepithelial Migration of Drosophila Germ Cells. *PLoS Biol* **1**, E80.
- Lage, P., Jan, Y. N. and Jarman, A. P.** (1997). Requirement for EGF receptor signalling in neural recruitment during formation of Drosophila chordotonal sense organ clusters. *Curr Biol* **7**, 166-75.
- Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.
- Laski, F. A., Lio, D., Rubin, G.** (1986). Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *C.* **44**, 7-19.
- Lee, T., Hacohen, N., Krasnow, M. and Montell, D. J.** (1996). Regulated Breathless receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the Drosophila tracheal system. *Genes Dev* **10**, 2912-21.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W.** (2003). Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-9.
- Lehmann, R., Jiménez, F., Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. A.** (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. *Roux's Arch Biol.* **192**, 62-74.
- Leiserson, W. M., Harkins, E. W. and Keshishian, H.** (2000). Fray, a Drosophila serine/threonine kinase homologous to mammalian PASK, is required for axonal ensheathment. *Neuron* **28**, 793-806.
- Lemke, G.** (2001). Glial control of neuronal development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 87-105.
- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L. and Tessier-Lavigne, M.** (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC 5 are candidate netrin receptors. *Nature* **386**, 833-8.
- 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).
- Liu, Y. and Montell, D. J.** (2001). Jing: a downstream target of slbo required for developmental control of border cell migration. *Development* **128**, 321-30.
- McDonald, J. A., Pinheiro, E. M. and Montell, D. J.** (2003). PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development* **130**, 3469-78.
- 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.
- Menne, T. V., Luer, K., Technau, G. M. and Klämbt, C.** (1997). CNS midline cells in *Drosophila* induce the differentiation of lateral neural cells. *Development* **124**, 4949-58.
- Molyneaux, K. A., Zinszner, H., Kunwar, P. S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M. J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C. et al.** (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* **130**, 4279-86.
- Montell, D. J.** (2001). Command and control: regulatory pathways controlling invasive behavior of the border cells. *Mech Dev* **105**, 19-25.
- Montell, D. J., Rorth, P. and Spradling, A. C.** (1992). slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell* **71**, 51-62.
- Moore, A. W., Barbel, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2000). A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10436-41.
- 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.
- Mueller, B. K.** (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* **22**, 351-88.
- Murphy, A. M., Lee, T., Andrews, C. M., Shilo, B. Z. and Montell, D. J.** (1995). The breathless FGF receptor homolog, a downstream target of *Drosophila* C/EBP in the developmental control of cell migration. *Development* **121**, 2255-63.
- Murphy, A. M. and Montell, D. J.** (1996). Cell type specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **133**, 617-30.
- 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.
- Nabel-Rosen, H., Dorevitch, N., Reuveny, A. and Volk, T.** (1999). The balance between two isoforms of the *Drosophila* RNA-binding protein how controls tendon cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 573-84.
- Nabel-Rosen, H., Volohonsky, G., Reuveny, A., Zaidel-Bar, R. and Volk, T.** (2002). Two isoforms of the *Drosophila* RNA binding protein, how, act in opposing directions to regulate tendon cell differentiation. *Dev Cell* **2**, 183-93.
- 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.
- Niewiadomska, P., Godt, D. and Tepass, U.** (1999). DE Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **144**, 533-47.

- Noordermeer, J. N., Kopczynski, 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.
- Novotny, T., Eiselt, R. and Urban, J.** (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **129**, 1027-36.
- Ohshiro, T. and Saigo, K.** (1997). Transcriptional regulation of breathless FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea. *Development* **124**, 3975-86.
- Paroush, Z., Finley, R. L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R. and Ish-Horowicz, D.** (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-15.
- Perrimon, N., Engstrom, L. and Mahowald, A. P.** (1984). Developmental genetics of the 2E-F region of the *Drosophila* X chromosome: a region rich in "developmentally important" genes. *Genetics* **108**, 559-72.
- Phippen, T. M., Sweigart, A. L., Moniwa, M., Krumm, A., Davie, J. R. and Parkhurst, S. M.** (2000). *Drosophila* C-terminal binding protein functions as a context-dependent transcriptional co-factor and interferes with both mad and groucho transcriptional repression. *J Biol Chem* **275**, 37628-37.
- Poortinga, G., Watanabe, M. and Parkhurst, S. M.** (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *Embo J* **17**, 2067-78.
- Raisin-Tani, S. and Leopold, P.** (2002). *Drosophila* crooked-neck protein co-fractionates in a multiprotein complex with splicing factors. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 288-92.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J.** (2000). Selecting a Longitudinal Pathway: Robo Receptors Specify the Lateral Position of Axons in the *Drosophila* CNS. *Neuron* **28**, 767-777.
- Rangarajan, R., Courvoisier, H. and Gaul, U.** (2001). Dpp and Hedgehog mediate neuron-glia interactions in *Drosophila* eye development by promoting the proliferation and motility of subretinal glia. *Mech Dev* **108**, 93-103.
- Rangarajan, R., Gong, Q. and Gaul, U.** (1999a). Migration and function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* **126**, 3285-92.
- Read, D., Levine, M. and Manley, J. L.** (1992). Ectopic expression of the *Drosophila* tramtrack gene results in multiple embryonic defects, including repression of even-skipped and fushi tarazu. *Mech Dev* **38**, 183-195.
- Rebay, I. and Rubin, G. M.** (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* **81**, 857-66.
- Reichman-Fried, M. and Shilo, B. Z.** (1995). Breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation. *Mech Dev* **52**, 265-73.
- 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.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. et al.** (1998). Systematic gain of function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-57.

- Rothberg, J. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1992). Modularity of the slit protein. Characterization of a conserved carboxy terminal sequence in secreted proteins and a motif implicated in extracellular protein interactions. *J Mol Biol* **227**, 367-70.
- Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). *slit*: an EGF-homologous locus in *Drosophila melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* **55**, 1047-1059.
- 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.
- Salzberg, A., D., D. E., Schulze, K. L., Lee, J. K., Strumpf, D., Tsai, L. and Bellen, H. J.** (1994). Mutations affecting the pattern of the PNS in *Drosophila* reveal novel aspects of neuronal development. *Neuron* **13**, 269-87.
- Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D. C., Guillemin, K. and Krasnow, M. A.** (1996a). Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* **122**, 1395-407.
- Samakovlis, C., Manning, G., Steneberg, P., Hacohen, N., Cantera, R. and Krasnow, M. A.** (1996b). Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development* **122**, 3531-6.
- 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.
- Schmucker, D., Jackle, H. and Gaul, U.** (1997). Genetic analysis of the larval optic nerve projection in *Drosophila*. *Development* **124**, 937-48.
- Scholz, H., Deatricks, J., Klaes, A. and Klämbt, C.** (1993). Genetic dissection of pointed, a *Drosophila* gene encoding two ETS related proteins. *Genetics* **135**, 455-68.
- 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.
- Schulte, J., Tepass, U. and Auld, V. J.** (2003). Gliotactin, a novel marker of tricellular junctions, is necessary for septate junction development in *Drosophila*. *J Cell Biol* **161**, 991-1000.
- 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.
- Schweisguth, F.** (2004). Notch signaling activity. *Curr Biol* **14**, R129-38.
- 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.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D. and Goodman, C. S.** (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**, 409-26.
- Sepp, K. J. and Auld, V. J.** (2003a). Reciprocal interactions between neurons and glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *J Neurosci* **23**, 8221-30.

- Sepp, K. J. and Auld, V. J.** (2003b). RhoA and Rac1 GTPases mediate the dynamic rearrangement of actin in peripheral glia. *Development* **130**, 1825-35.
- Sepp, K. J., Schulte, J. and Auld, V. J.** (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* **30**, 122-33.
- Sepp, K. J., Schulte, J. and Auld, V. J.** (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* **238**, 47-63.
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M. and Tessier-Lavigne, M.** (1994). The netrins define a family of axon outgrowth promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC 6. *Cell* **78**, 409-424.
- Shellenbarger, D. L. and Mohler, J. D.** (1978). Temperature-sensitive periods and autonomy of pleiotropic effects of *l(1)Nts1*, a conditional notch lethal in *Drosophila*. *Dev Biol* **62**, 432-46.
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T. and Saigo, K.** (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm specific *Drosophila* FGF receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* **124**, 2119-28.
- Silver, D. L. and Montell, D. J.** (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* **107**, 831-41.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (2000). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: A combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* **103**, 1019-1032.
- Song, H. and Poo, M.** (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* **3**, E81-8.
- 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.
- 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, J. A., Broihier, H. T., Moore, L. A. and Lehmann, R.** (2002). Slow as molasses is required for polarized membrane growth and germ cell migration in *Drosophila*. *Development* **129**, 3925-34.
- 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.
- Stollewerk, A., Klämbt, C. and Cantero, R.** (1996). Electron microscopic analysis of *Drosophila* midline glia during embryogenesis and larval development using beta galactosidase expression as endogenous cell marker. *Microsc Res Tech* **35**, 294-306.
- Stone, J. and Dreher, Z.** (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* **255**, 35-49.
- Sutherland, D., Samakovlis, C. and Krasnow, M. A.** (1996). branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091-101.
- Takizawa, K. and Hotta, Y.** (2001). Pathfinding analysis in a glia-less *gcm* mutant in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **211**, 30-6.

- 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.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33.
- Thummel, C. S., Boulet, A. M. and Lipshitz, H. D.** (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445-56.
- 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.
- 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.
- Wang, S., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1997). Only a subset of the binary cell fate decisions mediated by Numb/Notch signaling in *Drosophila* sensory organ lineage requires Suppressor of Hairless. *Development* **124**, 4435-46.
- 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.
- Watanabe, T. and Raff, M. C.** (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**, 834-7.
- Wen, Y., Nguyen, D., Li, Y. and Lai, Z. C.** (2000). The N-terminal BTB/POZ domain and C-terminal sequences are essential for Tramtrack69 to specify cell fate in the developing *Drosophila* eye. *Genetics* **156**, 195-203.
- Wilk, R., Weizman, I. and Shilo, B. Z.** (1996). trachealess encodes a bHLH PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**, 93-102.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wolf, C., Gerlach, N. and Schuh, R.** (2002). *Drosophila* tracheal system formation involves FGF-dependent cell extensions contacting bridge-cells. *EMBO Rep* **3**, 563-8.
- Wolf, C. and Schuh, R.** (2000). Single mesodermal cells guide outgrowth of ectodermal tubular structures in *Drosophila*. *Genes Dev* **14**, 2140-5.
- Wong, C. W. and Privalsky, M. L.** (1998). Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol Cell Biol* **18**, 5500-10.
- 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.** (1993). tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye. *Genes and Development* **7**, 1085-1096.
- Yu, F., Ong, C. T., Chia, W. and Yang, X.** (2002). Membrane targeting and asymmetric localization of *Drosophila* partner of *inscuteable* are discrete steps controlled by distinct regions of the protein. *Mol Cell Biol* **22**, 4230-40.
- Yuan, L. L. and Ganetzky, B.** (1999). A glial-neuronal signaling pathway revealed by mutations in a neurexin-related protein. *Science* **283**, 1343-5.
- 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.

- Zelzer, E., Wappner, P. and Shilo, B. Z.** (1997). The PAS domain confers target gene specificity of Drosophila bHLH/PAS proteins. *Genes Dev* **11**, 2079-89.
- Zhang, K., Smouse, D. and Perrimon, N.** (1991). The crooked neck gene of Drosophila contains a motif found in a family of yeast cell cycle genes. *Genes Dev* **5**, 1080-91.
- 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.
- Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H. and Nambu, J. R.** (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of Drosophila central nervous system midline cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5131-6.
- Zierau, A.** (2003). Genetische Analyse der Migration glialer Zellen im peripheren Nervensystem von *Drosophila*. *Diplomarbeit*.
- Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L. and Laski, F. A.** (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10717-10721.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
EMS	Ethylmethylsulfonat
EtOH	Ethanol
GS	Goat-Serum (Ziegenserum)
h	Stunde(n)
HRP	Meerretich-Peroxidase
ISN	Intersegmentalnerv
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MetOH	Methanol
MWP	Multiwellplatte
NBT	Nitro-blautetrazolium-Chlorid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
RBG	Retinobasalgliazellen
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
SN	Segmentalnerv
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
ü. N.	über Nacht
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verwendete Oligonukleotide

Klonierung genomischer Fragmente möglicher Interaktionspartner von *tango*

cggcctcaaggaacgggtatgt	<i>Rst(1)JH</i> for
------------------------	---------------------

gaggcgggcaaatacgggactg	<i>Rst(1)JH</i> rev
------------------------	---------------------

cctcaattatgctggccaactcctg	<i>cranky</i> for
---------------------------	-------------------

ggcactaccaccacccccctgactt	<i>cranky</i> rev
---------------------------	-------------------

gctcggtgctgtgcctcatc	<i>tai</i> for
----------------------	----------------

gcaaaccgcccgaataagt	<i>tai</i> rev
---------------------	----------------

ggcgagtccacttaccggctattcac	<i>gcefor</i>
----------------------------	---------------

tggcatggggcaactcgtatcg	<i>gcerev</i>
------------------------	---------------

ggccaccgctagaagacga	<i>spinelessfor</i>
---------------------	---------------------

aatgtttttatgcgggcgacta	<i>spinelessrev</i>
------------------------	---------------------

acatcttcggtgctgcgggactatca	<i>simafor</i>
----------------------------	----------------

aacatttttcatcggtatcttcattg	<i>simarev</i>
----------------------------	----------------

gggtgcccggcgctccttcttct	<i>cycfor</i>
-------------------------	---------------

atctcaaacgcccggcgccagcaact	<i>cycrev</i>
----------------------------	---------------

gcagccgcttaccctcgattgtggat	<i>trhfor</i>
----------------------------	---------------

attggttggggcgggggttagatta	<i>trhrev</i>
---------------------------	---------------

Klonierung von pWIZ/RNAi Konstrukten

AGCTGCTCGTTCTGCTGCTTCTAGAGGGGA	pWIZ <i>cranky</i> -rev
--------------------------------	-------------------------

GAACCGGATTGCTATGCCATCTAGACTCAT	pWIZ <i>cranky</i> -for
--------------------------------	-------------------------

AAGGCCGTGCTGCGGCTCATCTAGAATCTG	pWIZ <i>gce</i> -for,
--------------------------------	-----------------------

GTGAGCAGTGCTGCCCTCTCTAGATTGGA	pWIZ <i>gce</i> -rev
-------------------------------	----------------------

CATCCGCATCATCAGCTGCTCTAGACGGCG	pWIZ <i>spine</i> -for
--------------------------------	------------------------

CAGTACCCATACCCGATTCTCTAGAAGATT	pWIZ <i>spine</i> -rev
--------------------------------	------------------------

AGACTGGGTCAGTGGTTTCTCTAGATGACT	pWIZ <i>sima</i> -for
--------------------------------	-----------------------

TTGGTGGGGATGGGTCCTGTCTAGATGTCA	pWIZ <i>sima</i> -rev
--------------------------------	-----------------------

TGCAGCGAGCACGCAAAGCTCTAGACTTGG	<i>crnpWIZ</i> for
--------------------------------	--------------------

CTGCACGTTACAGCTCCGCATCTAGACCGCT	<i>crnpWIZ</i> rev
---------------------------------	--------------------

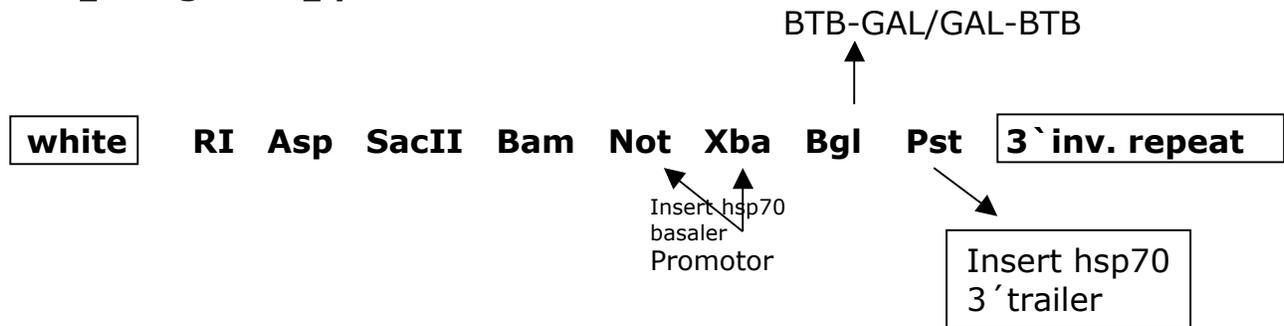
crooked neck Sequenzierungsprimer

<i>crn-1</i>	TTAATTGAAACACACATTCA
<i>crn-1b</i>	GTGGAGACAAAAAGCGATTA
<i>crn-2</i>	TCCGATCCCGCCGAGTTGGC
<i>crn-3-</i>	AGTGGCAACCGGAGGAGCAG
<i>crn-4-</i>	GTACGGCGACAGAGCGGGTA
<i>crn-5</i>	CGCTGCAAGGAGCTGCAGCGz
<i>crn-6</i>	ATGTGAAAGTGTGGATGTCTG
<i>crn-7</i>	GTGGAAGACACAAAAAGACA
<i>crnrev-1</i>	GTAAGAACTTTATAATCTCT
<i>crnrev-2</i>	GGAAAGATGTAGTCGAATAC
<i>crnrev-3</i>	CGCCTAGGGCTACCTCGAAG
<i>crnrev-4</i>	GTGAGGTATTAGCTCCAGAC
<i>crnrev-5</i>	GGTAGGTGATCTAAAGCGTA
<i>crnrev-6</i>	CCTCCATGTAGGTGTACTION
<i>crnrev-7</i>	CTCACGGAGCAACTGCTCCG
<i>crn-lower</i>	GGTTCACATACTCTGTTTTACACT
<i>crn-lower-RI</i>	TTGGGGAGAAGAATTCTAAAGCACAATA
<i>crn-upper</i>	CCGTTTTATTTTTAACCCAACAATG
<i>crn-upper-RI</i>	ATTCAAAAGTAGAATTCGCAAAAGGCCA

Übersicht der erstellten GAL/BTB bzw. BTB/GAL Klone

Vektor zur Expression der GAL-BTB/BTB-GAL Proteine

Ausgang: pWBGP
PSTI \square Religation \square pWP



\square pWhspPT - No.10 pWhspPT GALBTB/No.2 pWhspPT BTB/GAL

zudem: beide Varianten als Bgl bzw. Bgl/Bam Fragmente in CasperRhs
(No.6 pCasperRhsGALBTB, No.2 pCasperRhsBTBGAL)

Zwischenkonstrukte: No.18 psk⁺GALBTB/No.5 psk⁺BTBGAL

No. 10 pCasper3Ubi-BTBGAL-Konstrukt
modifiziertes BTBGAL (zusätzlich *pntP2* Sequenzabschnitt „spacer“)

No. 8.3 pGEM-T-easy GAL915; No. 4 pGEM-T-easy GALstop;
No. 9 pGEM-T-easy 8Xmyc

GAL4-BTB-myc Map (1 > 1759) Site and Sequence

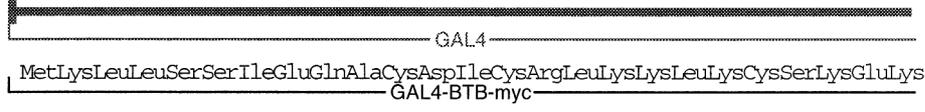
Enzymes : 50 of 480 enzymes (Filtered)

Settings : Circular, Subrange Context, Certain Sites Only, Standard Genetic Code

Hind III Sph I

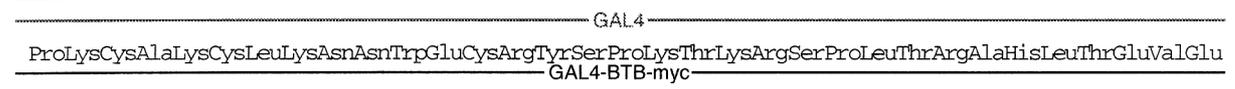
AAGCTTGAAGCAAGCCTCCTGAAAGATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCCTCCAAAGAAAA 100

TTTCGAACCTTCGTTTCGAGGACTTTCTACTTTCGATGACAGAAGATAGCTTTGTTTCGTACGCTATAAACGGCTGAATTTTTCGAGTTTCACGAGGTTTCTTTT



CCGAAGTCCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCTACTCTCCCAAAAACAAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAAAT 200

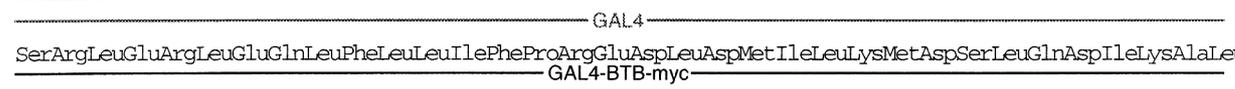
GGCTTCACGGGTTTCACAGACTTCTTTGTTGACCTCACAGCGATGAGAGGGTTTGGTTTTCAGAGGCGACTGATCCCGTGTAGACTGTCTTCACCTTA



Ava I Xho I Sci I

CAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCCTCGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATTTCTTTACAGGATATAAAAGCATT 300

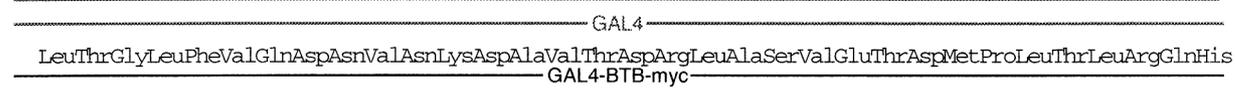
GTTCGGATCTTTCTGACCTTGTTCGATAAAGATGACTAAAAAGGAGCTCTTCTGGAAGTGTACTAAAACCTTTTACCTAAGAAATGTCCTATATTTTCGTAA



Hinc II Hpa I

GTTAACAGGATTATTTGTACAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTCACAGATAGATTTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCTCTAACATTGAGACAGCAT 400

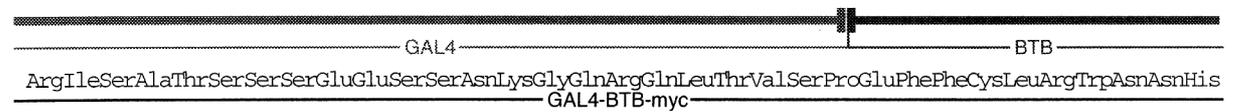
CAATTGTCTTAATAAACATGTTCTATTACACTTATTCTTACGGCAGTGTCTATCTAACCGAAGTCACCTCTGACTATACGGAGATTGTAACCTGTGCTGA



Hinc II EcoR I

AGAATAAGTGGACATCATCATCGGAAGAGTAGTAAACAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGGAATTTCTGCTGCGGTGGAACAACCACC 500

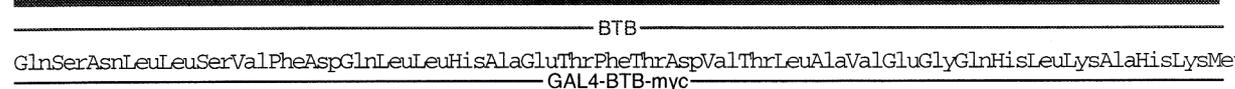
TCTTATTACGCTGTAGTAGTAGCCTTCTCTCATCTATTGTTTCCAGTTTCTGTCAACTGACATAGCCGCCTTAAGAAGACGGACGCCACCTTGTGTGGTGG



Pvu II

AGAGCAACCTTCTGTCCGCTTCGACCAGCTGTGTGACGCGAGAAACCTTTCACAGATGTGACGCTGGCCGTCGAGGGGCAACACCTGAAGGCACACAAGAT 600

TCTCGTGGAGACAGGCAGAAGCTGGTCGACAACGTGCGTCTTTGGGAAGTGTCTTACACTGCCGACCGCAGCTCCCGTGTGGACTTCCGTTGTGTTCTA



GlnSerAsnLeuLeuSerValPheAspGlnLeuLeuHisAlaGluThrPheThrAspValThrLeuAlaValGluGlyGlnHisLeuLysAlaHisLysMet

Pst I
GGTGGCTATCCGCTGCAGTCCCTACTTCAATACCCCTCTTTGTAAGTCAATCCGAAAAGCATCCGATTTGTCATACTTAAGGATGTGCCCTACTCGGACATG

CCACGATAGGCGGACGTCAGGATGAAGTTATGGGAGAAACATTCAGTAGGCCTTTTCGTAGGCTAACAGTATGAAATTCCTACACGGGATGAGCCTGTAC

700

----- BTB -----
ValLeuSerAlaCysSerProTyrPheAsnThrLeuPheValSerHisProGluLysHisProIleValIleLeuLysAspValProTyrSerAspMet
----- GAL4-BTB-myc -----

AAGTCGTTGCTAGACTTTTATGTACAGGGGCGAGGTCTCAGTGGACCAGGAGCGACTCACTGCAITTCCTGCGCGTGGCCGAGAGCCTGCCGATCAAGGGCC

TTCAGCAACGATCTGAAATACATGTCCCGCTCCAGAGTCACCTGGTCTCGCTGAGTGCAGTAAGGACGCGCACCGGCTCTCGGACGGTAGTTCCCGG

800

----- BTB -----
LysSerLeuLeuAspPheMetTyrArgGlyGluValSerValAspGlnGluArgLeuThrAlaPheLeuArgValAlaGluSerLeuArgIleLysGly
----- GAL4-BTB-myc -----

Hinc II Nae I Pvu II Pst I Pvu II Pst I
TCACCGAGGTCAACGACGACAAGCCCTCGCCGGCAGCAGCAGCTGCAGGAGCGGGTGCACGGGCTCTGAGAGCACAGCCACTACACCCAGCTGCAGCG

AGTGGCTCCAGTTGCTGCTGTTTCGGGAGCGCGGTGCTGCTGACGCTCTCGCCACGCTGCCCGAGACTCTCGTGTGGTGATGTGGGGTCGACGTCGC

900

----- BTB -----
LeuThrGluValAsnAspAspLysProSerProAlaAlaAlaAlaAlaAlaGlyAlaThrGlySerGluSerThrAlaThrThrProGlnLeuGlnArg
----- GAL4-BTB-myc -----

Nae I Bal I Hae I MscI
CATCCAACCGTATTTGGTGGCCCGAGCGAAATCGCTCGCAGGCCGGCGGTCTGCTGGCCAGTGCAGCCCAATGCCGAAATACACCCACCCCTGCCGGTGCAG

GTAGGTTGGCATAAACCACGGGTGCGCTTAGCGAGCGTCCGGCCGCGCAGACACCGGTACCGCGGTTACGGCTTTTATGTGGTGGGACGGCCACGTC

1000

----- BTB -----
IleGlnProTyrLeuValProGlnArgAsnArgSerGlnAlaGlyGlyLeuLeuAlaSerAlaAlaAsnAlaGlyAsnThrProThrLeuProValGln
----- GAL4-BTB-myc -----

CCATCGCTGCTCAGCTCGGCCCTGATGCCCAAGCGAAAGAGGGGCGAGACCCCGGAAGCTATCTGGCAGCTCGAATGGCACGGGGAACGACTACGACGACT

GGTAGCGACGAGTCGAGCCGGACTACGGTTCGCTTTCTCCCGTCTGGGCCTTCGATAGACCGTCCGAGCTTACCGTGCCTCTGCTGATGCTGCTGA

1100

----- BTB -----
ProSerLeuLeuSerSerAlaLeuMetProLysArgLysArgGlyArgProArgLysLeuSerGlySerSerAsnGlyThrGlyAsnAspTyrAspAsp
----- GAL4-BTB-myc -----

Dpn I Nru I
TTGATCGCGAGAACATGATGAACGACTCCTCGACCTGGGCAACGGCAAAAATGTGCAACGAGTCTACTCCGGCAATGACGATGGCTCCGACGACAATCA

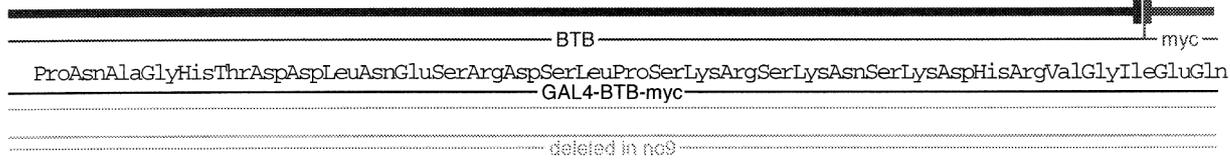
AACTAGCGCTCTTGTACTACTTGTGAGGAGGCTGGACCCGTTGCGGTTTACACGTTGCTCAGGATGAGGCGGTTACTGCTACCGAGGCTGCTGTTAGT

1200

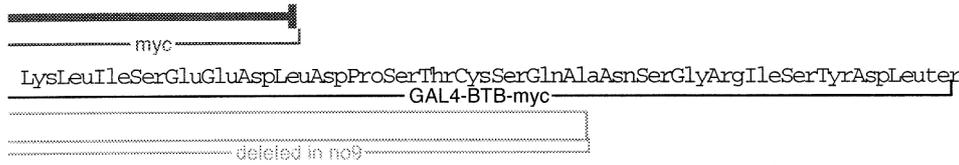
----- BTB -----
PheAspArgGluAsnMetMetAsnAspSerSerAspLeuGlyAsnGlyLysMetCysAsnGluSerTyrSerGlyAsnAspAspGlySerAspAspAsnGln
----- GAL4-BTB-myc -----

----- deleted in 109 -----

Dpn I Nru I Dpn I Sty I Dpn I Dra III Dpn I
GCCGAAACGCAGGACACACGGATGATCTAAATGAAAGTCGGGATTCCTCTGCCCTCGAAACGATCAAAGAAGTCCAAGGATCACCGGTGGGGATCGAGCAG 1300
CGGCTTGGCTCTGTGTGCTACTAGATTACTTTTCAGCGCTAAGAGACGGGAGCTTTGCTAGTTTCTTGAGGTTCTTAGTGGCGCACCCCTAGCTCGTC



BamH I Dpn I Sal I Hinc II Pst I
AAGCTGATCTCGGAGGAGGACCTGGATCCGTGACCTGCAGCCAAGCTAAATCCGGCGCAATTTCTTATGATTTATGATTTTATTTAATAAAGTTAT 1400
TTCGACTAGAGCCTCTCTCGACCTAGGCAGCTGGACGTCGGTTTCGATTAAAGCCCGCTTAAAGAATACTAAATACTAAAAATAATAATTTATTCATA



Dra I Dra I
AAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTAAAACGAAAATTCCTTGTCTTGAGTAACTCTTCCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTTCT 1500
TTTTTTTTTATTCACATATGTTTAAAATTTCACTGAGAATCCAAAATTTTGCCTTTAAGAACAAGAACTCATTGAGAAAGGACATCCAGTCCAACGAAAGA

Sph I Nae I
CAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAAATACTACTCAGTAATAACCTTAT 1600
GTCCATATCGTACTCCAGCGAGAATAACTGGTGTGGAGATGGCCGTACGGCCGTTACAGTGTGTTGTTATGAATTTATTTATGATGAGTCATTATTTGGATA

TTCTTAGCAITTTTGGACGAAATTTGCTATTTTGTAGAGTCTTTTACACCAATTTGCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTTAATC 1700
AAGAATCGTAAAACTGCTTTAAACGATAAAACAATCTCAGAAAATGTGGTAAACAGAGGTGTGGAGGCGAATGTAGTTGTGGTTATTGCGGTAAATTAG

Hind III
TAAGCGCATCACCAACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAAATGTAAGCTT 1759
ATTCGCGTAGTGGTTGTAAAAGACCGCAGTCAGGTGGTCGATTGTATTTTACATTCGAA

BTB-GAL4-myc Map (1 > 1533) Site and Sequence

Enzymes : 50 of 480 enzymes (Filtered)

Settings : Circular, Subrange Context, Certain Sites Only, Standard Genetic Code

Bgl II
Ncr I
Dpn I
Pvu II

GAAGATCTGTTTTAGCAGCTGTCAGGCCCGGAAGGAGAATAACCGAACCCATTGGACTAACGAAAGGACCAITTTGATGCCCCACTTGCATGAGGACATA
 CTCTAGACAAAATCGTCGACAGTCCGGGGCCTTCCTCTTAITGGCTTGGGTAACTGATTCCTTGGTAAACTACGGGGTGAACGTAAGTCTCTGTAT

100

Dpn I
Nru I
Dpn I
Pvu I

GATCGCGATCGCACACTCGGACATCGCTTAGTGACGCAACCACAGCCTCCCAATGAAGATGGCATCTCAACGCTTCTGCCTGCGGTGGAACAACCACC
 CTAGCGCTAGCGTGTGTGAGCCTGTAGCGAATCACTGCGTGTGGTGTGCGAGGGTTACTTCTACCGTAGAGTTGCGAAGACGGACGCCACCTTGTGTGGTGG

200



Pvu II

AGAGCAACCTTCTGTCCGCTTCGACCAGCTGTTCACGCAGAAACCTTCACAGATGTGACGCTGGCCGTCGAGGGGCAACACCTGAAGGCACACAAGAT
 TCTCGTTGGAAGACAGGCAGAACTGGTCGACAACGTCCGCTCTTTGGAAGTGTCTACACTGCGACCCGGCAGCTCCCCGTGTGGACTTCCGTGTGTCTTA

300

BTB
 GlnSerAsnLeuLeuSerValPheAspGlnLeuLeuHisAlaGluThrPheThrAspValThrLeuAlaValGluGlyGlnHisLeuLysAlaHisLysMet
 BTB-GAL4-myc

Pst I

GGTGCTATCCGCTGCAGTCCCTACTTCAATAACCTCTTTGTAAAGTATCCGAAAAGCATCCGATTGTCATACTTAAGGATGTGCCCTACTCGGACATG
 CCACGATAGGCGGACGTCAGGGATGAAGTTATGGGAGAAACATTCAGTAGGCCCTTTTCGTAGGCTAACAGTATGAATTCCTACACGGGATGAGCCTGTAC

400

BTB
 ValLeuSerAlaCysSerProTyrPheAsnThrLeuPheValSerHisProGluLysHisProIleValIleLeuLysAspValProTyrSerAspMet
 BTB-GAL4-myc

AAGTCGTTGCTAGACTTTATGTACAGGGCGAGGTCTCAGTGGACCAGGAGCGACTCACTGCAITTCCTGCGCGTGGCCGAGAGCCTGCGCATCAAGGGCC
 TTCAGCAACGATCTGAAATACATGTCCCGCTCCAGAGTCACCTGGTCTCGCTGAGTGACGTAAGGACGCGCACCGGCTCTCGACCGGTAGTTCCCGG

500

BTB
 LysSerLeuLeuAspPheMetTyrArgGlyGluValSerValAspGlnGluArgLeuThrAlaPheLeuArgValAlaGluSerLeuArgIleLysGly
 BTB-GAL4-myc

Hinc II
Nae I
Pvu II
Pst I
Pvu II
Pst I

TCACCGAGGTCAACGACGACAAGCCCTCGCCGGCAGCAGCTGCAGGAGCGGGTGCACGGGCTCTGAGAGCACAGCCACTACACCCAGCTGCAGCG
 AGTGGCTCCAGTTGCTGCTGTTTCGGGAGCGGCCGTCGTGTCGACGTCCTCGCCACGCTGCCCGAGACTCTCGTGTGCGGTGATGTGGGGTTCGACGTCGC

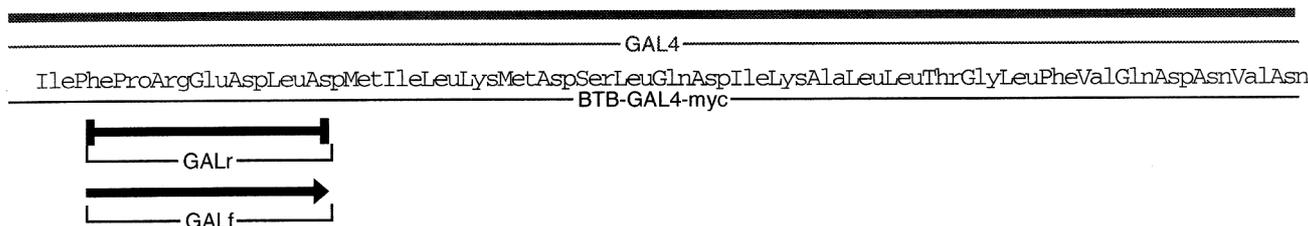
600

BTB
 LeuThrGluValAsnAspAspLysProSerProAlaAlaAlaAlaGlyAlaGlyAlaThrGlySerGluSerThrAlaThrThrProGlnLeuGlnArg
 BTB-GAL4-myc

Ava I
Xho I
Sca I
Hinc II
Hpa I

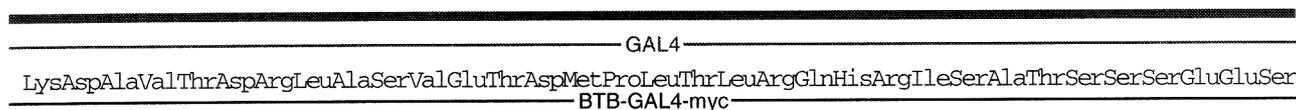
GATTTTTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAAT
CTAAAAAGGAGCTCTTCTGGAAGTGTACTAAAACCTTTTACCTAAGAAATGTCCATATATTTTCGTAAACAATGTCCCTAATAAACATGTTCTATTACACTTA

1300



AAAGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATAIGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCACATCATCATCGGAAGAGAGTA
TTTCTACGGCAGTGTCTATCTAACC GAAGTCACCTCTGACTATACGGAGATTGTAACCTCTGTCGTATCTTATTACAGCTGTAGTAGTAGCCTTCTCTCAT

1400

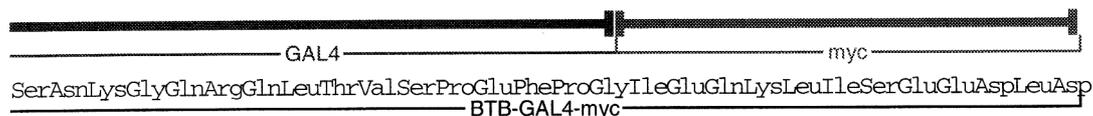


EcoR I
Ava I
Xma I
Sma I
Dpn I
Dpn I
BamH I
Dpn I
Sal I
Hinc II
Pst I

Hinc II

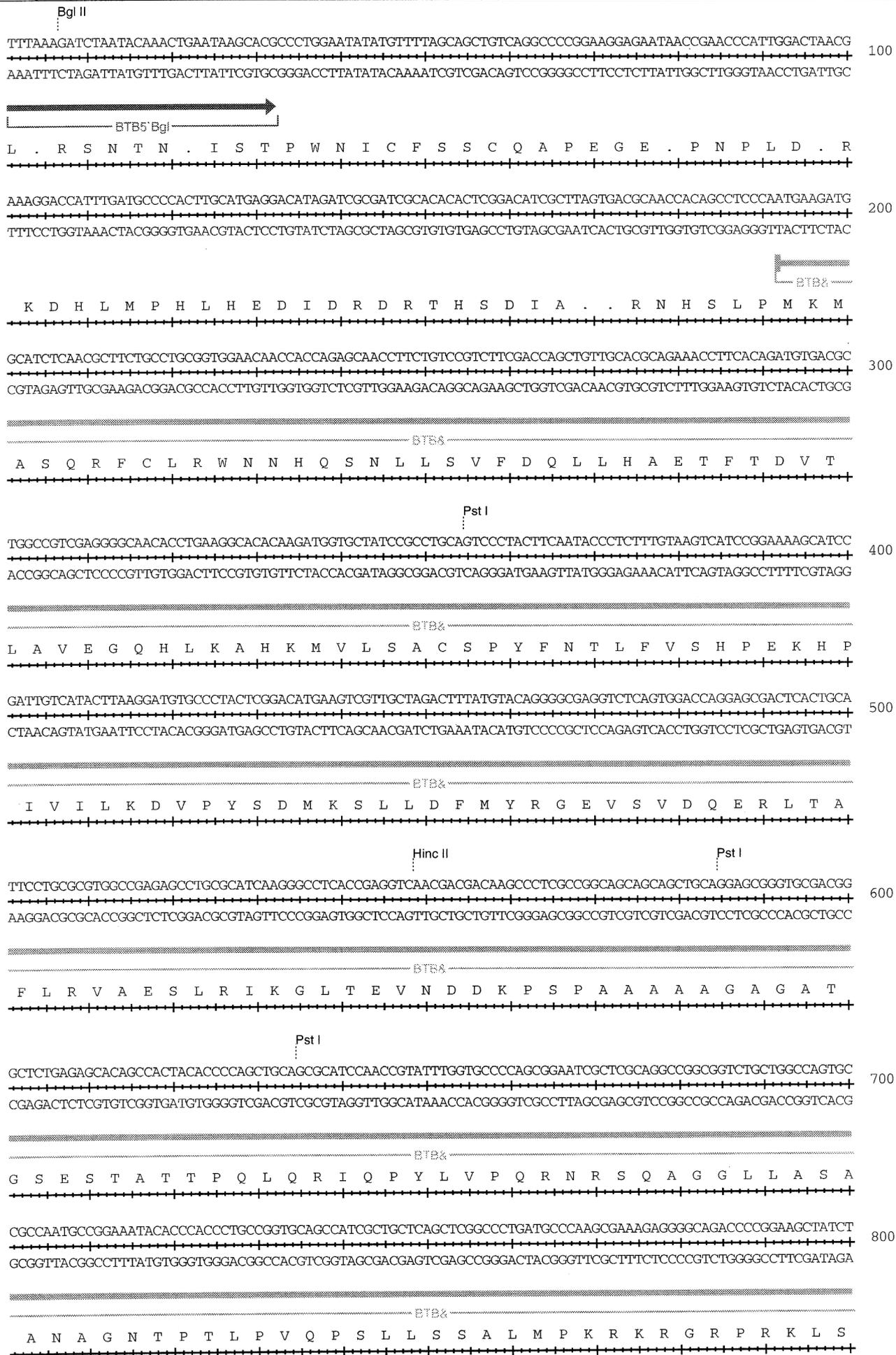
GTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGGAATTTCCCGGGATCGAGCAGAAGCTGATCTCGGAGGAGGACCTGGATCCGTCGACCTGCAGCCA
CAITGTTTTCCAGTTTCTGTCAACTGACATAGCCGCCCTTAAGGGCCCTAGCTCGTCTTCGACTAGAGCCTCCTCCTGGACCTAGGCAGCTGGACGTCGGT

1500



AGCTAATTCGGGCGAATTTCTTATGATTTATG
TCGATTAAGGCCCGCTTAAAGAATACTAAATAC

1533



Sac I
Sst I
CAGTGGGCCAACCGCGCGCAGGAGCTCCGGTGGCGGTGGCGATGAAAGCGATTATCACAGCACGATCTCGGCGCAGGATCACCAGAGTCAGCAATCGAGT 1700
GTCACCCGGTTGGCCGCGCTCCTCGAGGCCACCGCCACCGCTACTTTTCGCTAATAGTGTGCTGCTAGAGCCGCGTCTAGTGGTCTCAGTCGTTAGCTCA

BTB3
S G P T G G R S S G G G G D E S D Y H S T I S A Q D H Q S Q Q S S
GGAGGAAAATGGCAGTGGAGGAGCCAGCGGTGGAAGCACCGGAAACAGCAACGGTTACTTTGGACAGCAGCTCGGAGTTCTATGGCAGTTACCGGGGCAGGA 1800
CCTCCTTTACCGTCACCTCCTCGGTCCCACTTCGTTGGCCTTTGTCGTTGCCAATGAACCTGTCGTCGAGCCTCAAGATACCGTCAATGCGCCCGTCTCT

BTB3
BTB3' BAM
G G N G S G G A S G G S T G N S N G Y L D S S S E F Y G S Y A G R

Sph I
TCTACCTACTGTCTTCTATCGAACAAAGCATGCGATATTTGCGGACTTAAAAAGCTCAAGTGTCTCCAAAGAAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAA 1900
AGATGGATGACAGAAGATAGCTTGTTCGTACGCTATAAACGGCTGAAATTTTCGAGTTCACGAGGTTCTTTTGGCTTCACGCGGTTACAGACTTCTTT

GAL5' Bgl
GALSTOP
I Y L L S S I E Q A C D I C R L K K L K C S K E K P K C A K C L K N

CAACTGGGAGTGTCTACTCTCCCAAACAAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTA 2000
GTTGACCCTCACAGCGATGAGAGGGTTTTGGTTTTCAGAGGGGACTGATCCCGTGTAGACTGTCTTACCTTAGTTCGGATCTTTCTGACCTTGTGCGAT
GALSTOP
N W E C R Y S P K T K R S P L T R A H L T E V E S R L E R L E Q L

Xho I Hinc II
TTTCTACTGATTTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTGAAAATGGATTTCTTTACAGGATATAAAAAGCATTTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATA 2100
AAAGATGACTAAAAGGAGCTCTTCTGGAACGTGACTAAAACCTTTTACCTAAGAAATGTCTATATTTTCGTAACAATTTGCTCAATAAACATGTTCTAT
GALSTOP
F L L I F P R E D L D M I L K M D S L Q D I K A L L T G L F V Q D

ATGTGAATAAAGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCCTTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCACATCATCATCGGA 2200
TACACTTATTTCTACGGCAGTGTCTATCTAACCGAAGTCACCTCTGACTATACGGAGATTGTAACCTCTGTCGTATCTTATTCACGCTGTAGTAGTAGCCT
GALSTOP
N V N K D A V T D R L A S V E T D M P L T L R Q H R I S A T S S S E

Hinc II Sma I BamH I Sal I Hinc II
AGAGAGTAGTAAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGTAATTCCTGGGGATCCGTCGAC 2265
TCTCTCATCATTTGTTTCCAGTTTCTGTCAACTGACATAGCGGCATTAAAGGGCCCCTAGGCAGCTG

3' GALSTOP
GALSTOP
E S S N K G Q R Q L T V S P . F P G I R R

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 Diskussionsbereitschaft. Mein großer Dank auch an ihn für die praktische Hilfe (z.B. die Durchführung der EM Fixierungen).

Bei Herrn Prof. Dr. Wilfried Janning möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Elke Naffin und Rita Hassenrück haben die EM Analysen ermöglicht, dafür auch einen herzlichen Dank.

Besonderer Dank geht an Karin Krukkert für die erfolgreiche und unterhaltsame Zusammenarbeit an den zahlreichen Benches. Dieser Dank gilt natürlich auch Jan Pielage (vermißt momentan auch die Zusammenarbeit an zahlreichen Theken).

Hierbei nicht zu vergessen die anderen ehemaligen und gegenwärtigen Mitstreiter des Fliegenraums: Dirk Langehans, Susanne Önel, Sebastian Granderath, Angelika Kippert und Liane Bolke. An Liane Extradank für das (meistens linke) offene Ohr und die Hilfe.

Für viele Anregungen, Hilfe und weiterführende Gespräche möchte ich mich bei Jens Hillebrand, Jörn Hülsmeier, Thomas Hummel, Britta Koch, Uwe Lammel, Kristina Schimmelpfeng, Tobias Stork und Ariane Zierau bedanken.

Ein Riesendank auch an die Mitglieder der AGs Klämbt und Hummel für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und jede Menge Spaß.

