

Zoologie

**Funktionelle und molekulare Charakterisierung
des *Drosophila*-Gens *schizo***

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

vorgelegt von

Susanne-Filiz Önel
aus Peine

2002

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Janning
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>12.12.02</u>
Tag der Promotion:	<u>13.12.02</u>

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Die Entstehung des embryonalen ZNS von <i>Drosophila</i>	1
1.2	Die Entstehung der Mittellinie in <i>Drosophila</i>	2
1.2.1	Spezifizierung der Mittellinienvorläuferzellen	2
1.2.2.	Aufgabe der Mittellinienzellen	3
1.3	Axonale Wegfindung	4
1.4	Mechanismen der axonalen Wegfindung	5
1.5	Identifizierung molekularer Mechanismen bei der kommissuralen Musterbildung	6
1.5.1	Identifizierung von attraktiven Signalkomponenten	7
1.5.2	Identifizierung repulsiver Signalkomponenten	8
1.5.3	Identifizierung neuer Signalmoleküle, die an der Bildung der Kommissuren beteiligt sind	11
1.6	Die Rolle der Endozytose während der axonalen Wegfindung	11
1.7	Die Rolle der Superfamilie der Ras GTPasen in der axonalen Wegfindung	12
1.8	Die Rolle von Guanine-Nucleotid-Austauschfaktoren in der axonalen Wegfindung	13
1.9	Ziel der Arbeit	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Puffer, Medien, Lösungen	16
2.1.3	Bakterienstämme und Vektoren	22
2.1.3.1	Bakterienstämme	22
2.1.3.2	Vektoren	22
2.1.4	Verwendete Antikörper	22
2.1.4.1	Primäre Antikörper	22
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper	23
2.1.5	Fliegenstämme	23
2.1.5.1	Deletionsmutationen	23
2.1.5.2	P-Element-Insertionen	25
2.1.5.3	Balancer-Chromosomen	25
2.1.5.4	Translokationen und Duplikationen	25
2.1.5.5	Verwendete <i>GAL4</i> -Treiber-Linien	26
2.1.5.6	Verwendete <i>UAS</i> -Effektor-Linien	26
2.1.5.7	Enhancer-Trap-Linien	27

2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Genetische Methoden	27
2.2.1.1	Fliegenzucht	27
2.2.1.2	Sammeln von Embryonen.....	27
2.2.1.3	Keimbahntransformation	27
2.2.1.4	DNA-Injektion	28
2.2.1.5	Selektion von transgenen Fliegen	28
2.2.1.6	Bestimmung des Insertionsortes	29
2.2.2	Mutagenesen	29
2.2.2.1	$\Delta 2$ -3-Reversionsmutagenese	29
2.2.2.2	$\Delta 2$ -3-Transposonexzisionsmutagenese.....	30
2.2.2.3	„Local Hops“	30
2.2.2.4	Herstellung von Rekombinanten.....	31
2.2.3	Histologische Methoden	32
2.2.3.1	<i>whole mount</i> -Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	32
2.2.3.2	Nachweisreaktionen	33
2.2.3.2.1	AP-Färbung.....	33
2.2.3.2.2	HRP-Färbung	33
2.2.3.2.3	Antikörperfärbung mit dem ABC-Kit	33
2.2.3.2.4	X-Gal-Färbung	34
2.2.3.3	Präabsorption des anti- β -Galaktosidase Antikörpers	34
2.2.3.4	<i>whole mount-in situ</i> -Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	34
2.2.3.5	Einbetten von Embryonen nach <i>in situ</i> -Hybridisierung	36
2.2.3.6	Simultan-Fixierung von adulten Augen	36
2.2.3.7	Einbettung von adulten Augen.....	36
2.2.3.8	Herstellung von Gelatine-beschichteten Objektträgern	37
2.2.3.9	Herstellung von Glasmessern	37
2.2.3.10	Schneiden.....	37
2.2.3.11	Färbung mit Toluidinblau	37
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.4.1	Herstellung von elektrokompetenten Zellen.....	38
2.2.4.2	Elektrotransformation.....	38
2.2.4.3	DNA-Restriktion	39
2.2.4.4	Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel.....	39
2.2.4.5	Gelelektrophorese	39
2.2.4.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	40
2.2.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.4.8	Sichtung einer genomischen Phagenbank	40
2.2.4.8.1	Titrieren der Phagenbank.....	41
2.2.4.8.2	Ausplattieren der Phagen, Ziehen der Filter	41
2.2.4.8.3	Hybridisierung mit nicht-radioaktiver Sonde	42

2.2.4.8.4	Rescreen.....	42
2.2.4.8.5	Isolierung von Phagen-DNA	42
2.2.4.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	44
2.2.4.10	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	44
2.2.4.11	Isolierung genomischer DNA aus Fliegen.....	44
2.2.4.12	Restriktion genomischer oder Phagen-DNA für Southern-Blot-Analysen	45
2.2.4.13	Southern-Blot-Hybridisierung (modifiziert nach Church, 1984).....	45
2.2.4.13.1	Synthese fluorescein-markierter DNA-Sonden für Hybridisierungen	45
2.2.4.13.2	Hybridisierung mit der fluorescein-markierten DNA-Sonde	46
2.2.4.13.3	Hybridisierungsnachweis.....	46
2.2.4.14	Inverse-PCR	47
2.2.4.14.1	Single Fly-PCR	47
2.2.4.14.2	Reaktionskomponenten für die PCR-Amplifikation	47
2.2.3.14.3	Temperaturprofile.....	48
2.2.4.15	Aufreinigung von PCR-Produkten	49
2.2.4.16	Klonierung von PCR-Produkten	49
2.2.4.17	Sequenzierung	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Phänotypische Untersuchungen	50
3.1.1	Marker für die Untersuchung des axonalen Muster	50
3.1.2	ZNS-Defekte in <i>schizo</i> -Mutanten	51
3.1.3	Untersuchungen einer möglichen Interaktion zwischen dem Gen <i>schizo</i> und den Genen der axonalen Wegfindung <i>netrin</i> und <i>slit</i>	53
3.1.3.1	Doppelmutantenanalyse.....	53
3.1.3.2	Expression von <i>netrin</i> in <i>schizo</i> -Mutanten	54
3.1.3.3	Überexpression von Netrin in der Mittellinie im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund	55
3.1.3.4	Expression von SLIT in <i>schizo</i> -Mutanten	55
3.1.3.5	Nachweis der genetischen Interaktion von <i>slit</i> und <i>schizo</i>	56
3.1.3.6	Nachweis der genetischen Interaktion von <i>robo</i> und <i>schizo</i>	57
3.1.3.7	Genetische Interaktion von <i>schizo</i> und <i>Calmodulin</i>	57
3.1.4	Positionsdefekte in den Mittelliniengliazellen.....	58
3.1.5	PNS-Defekte in <i>schizo</i> -Mutanten.....	58
3.1.6	Migrationsdefekte in den peripheren Gliazellen	59
3.1.7	Defekte im visceralen Mesoderm von <i>schizo</i> -Mutanten	59
3.2	Genetische und zytologische Lokalisation des Gens <i>schizo</i>	60
3.2.1	Meiotische Kartierung des <i>schizo</i> -Lokus	60
3.2.2	Gene in der <i>schizo</i> -Region.....	61
3.2.3	Komplementationsanalyse der P-Insertionsanalyse	62
3.2.4	Reversionsmutagenese der Linie <i>l(3)3</i>	63

3.3	Molekulare Charakterisierung des <i>schizo</i> -Lokus	64
3.3.1	Isolierung genomischer Fragmente aus der Region um <i>schizo</i> und Identifizierung von Cosmid-Klonen.....	64
3.3.2	Induktion neuer <i>schizo</i> -Allele und deren molekulare Charakterisierung	64
3.3.2.1	Erzeugung neuer P-Insertionen im <i>schizo</i> -Lokus	64
3.3.2.2	Reversionsmutagenese der induzierten <i>schizo</i> -P-Element-Insertionen.....	65
3.3.2.3	Phänotypische Untersuchung der erhaltenen „jump in“-Linien	66
3.3.2.4	Molekulare Charakterisierung der neuen P-Insertionen.....	67
3.3.2.5	Southern-Blot Analyse der Linie <i>l(3)3</i>	67
3.3.2.6	PCR-Nachweis des P-Insertionsorts der Linie <i>l(3)3</i>	68
3.4	Sequenzierung und Expressionstudien der identifizierten cDNAs	68
3.4.1	Sequenzierung der cDNA-Klone GH10594 und LP01489	68
3.4.2	Identifizierung und Sequenzierung der cDNA-Klone RE44556, RE2256 und RE5442	69
3.4.3	Expressionstudien der identifizierten cDNAs.....	70
3.5	SCHIZO als Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor (GEF).....	71
3.5.1	SCHIZO besitzt drei konservierte Domänen	71
3.5.2	Die Expression des Schizo P1-Proteins im Wildtyp	72
3.5.3	Identifizierung der ARF6-GTPase in <i>Drosophila</i>	73
3.6	Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen dem Gen <i>schizo</i> und den GTPasen Drac1 und Dcdc42	73
3.7	Überexpression von <i>schizo t1</i>	74
3.7.1	Überexpression der LP01489 cDNA in <i>schizo</i> -mutanten Embryonen.....	75
3.7.2	Ektopische Expression des <i>schizo</i> -Gens.....	76
3.7.2.1	Überexpression von UAS- <i>schizo</i> im ZNS	76
3.7.2.2	Überexpression von UAS- <i>schizo</i> in den dorsozentralen mechano- sensorischen Organen	76
3.7.2.3	Überexpression von UAS- <i>schizo</i> im Auge	77
3.7.2.4	Versuch der Abschwächung des Augen-Phänotyps durch Herausnahme einer Kopie <i>schizo</i>	79
3.7.2.5	Überexpression der <i>schizo</i> cDNA im Mitteldarm.....	80
3.8	Sequenzierung der <i>schizo</i> EMS-Mutanten	80
4.	Diskussion	81
4.1	Die phänotypische Analyse des Gens <i>schizo</i>	81
4.1.1	Der neuronale Phänotyp <i>schizo</i> -mutanter Embryonen.....	81
4.1.2	Beteiligung von <i>schizo</i> am Auswachsen der peripheren Neurone und der Migration der peripheren Gliazellen	85
4.1.3	Die Rolle von <i>schizo</i> bei der Bildung des Mitteldarms.....	86
4.2	Die molekulare Analyse des Gens <i>schizo</i>	87
4.3	<i>schizo</i> als <i>Drosophila Sec7</i> Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor	90

4.3.1	Die Funktion der ARF-GTPase ARF6	91
4.3.2	Ist <i>schizo</i> an der Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt?.....	93
4.3.2.1	Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts durch die Aktivierung des ADP- Ribosylierungsfaktors 6	93
4.3.2.2	Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts durch die kleine GTPase <i>Dcdc42</i>	93
4.4	Eine mögliche Funktion von <i>schizo</i> in der Endozytose bei der Kontrolle der Roundabout-Expression.....	96
4.5	Die Interaktion von <i>calmodulin</i> und <i>schizo</i>	99
5.	Zusammenfassung	100
6.	Literatur	101
7.	Anhang	120

1. Einleitung

1.1 Die Entstehung des embryonalen ZNS von *Drosophila*

Das Nervensystem der meisten Organismen besteht aus einer überwältigenden Anzahl von Neuronen, die in ihrer Größe, Form, Position und in ihren Verbindungen mit anderen Neuronen variieren. Diese Vielfältigkeit neuronaler Morphologie reflektiert die Vielfalt der funktionellen Komplexität des Nervensystems (Ramón y Cajal, 1911). Das zentrale embryonale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila melanogaster* ist in einem einfachen, strickleiterförmigen Axonmuster organisiert. Der einfache Aufbau des ZNS und seine genaue Charakterisierung (Campos-Ortega, 1993; Goodman & Doe, 1993) machen es zu einem geeigneten Modellsystem zur Untersuchung axonaler Wegfindungsprozesse.

Das embryonale ZNS von *Drosophila* gliedert sich in die beiden Gehirnhemisphären der Kopfreion und das ventral liegende Bauchmark. Es entsteht während der Embryogenese aus einer definierten Region des ventralen embryonalen Ektoderms, dem Neuroektoderm. Das ZNS geht dabei aus der ventralen neurogenen Region (VNE) und die beiden Gehirnhemisphären aus dem procephalen Neuroektoderm (PNE) hervor. Die Zellen des frühen Neuroektoderms sind äquivalent und können sich entweder zu neuronalen oder epidermalen Vorläuferzellen entwickeln. Dies geschieht durch die Expression der proneuralen Gene, die zur Klasse der *bHLH*-Transkriptionsfaktoren gehören. Doch nicht alle Zellen, die die proneuralen Gene exprimieren, werden zu neuronalen Vorläuferzellen. Das neuronale Entwicklungsschicksal ist vielmehr abhängig von der Expression der neurogenen Gene, zu denen *Notch* und *Delta* gehören. Die Aktivierung des *Notch*-Rezeptors durch den Liganden *Delta* hat zur Folge, daß die proneurale Genaktivität in diesen Zellen gehemmt wird. Nur die Zellen, die den *Delta*-Liganden exprimieren, delaminieren in das Innere des Embryos und werden zu neuronalen Vorläuferzellen, den sogenannten Neuroblasten (NB). In *Drosophila* delaminieren insgesamt rund 500 NB aus dem ventralen Neuroektoderm (Hartenstein &

Campos-Ortega, 1984), die in einer sich wiederholenden Reihenfolge von Neuomeren angeordnet sind. Pro abdominalem Hemi-Neuomer finden sich 30 NB, aus denen wiederum 350 Neurone und Gliazellen hervorgehen (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Ein einzelner NB kann aber nicht nur einen Typ von Neuron erzeugen, sondern bringt strukturell und funktionell unterschiedliche Neurone hervor. Definiert werden diese Neurone über ihre räumliche Anordnung im ZNS und ihre Abstammung. Die Zellstammbäume der Neurone in *Drosophila* sind vollständig beschrieben (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999). Ab dem Stadium 13 der embryonalen Entwicklung setzt die neuronale Differenzierung ein. Viele der axonalen Projektionen sind genau untersucht (Jacobs & Goodman, 1989a; Jacobs & Goodman, 1989b, Sink & Whittington, 1991, Merritt & Whittington, 1995).

Das Nervensystem von *Drosophila* ist wie das der meisten Invertebraten und Vertebraten bilateral-symmetrisch aufgebaut. Die beiden Hälften des Nervensystems werden durch eine Gruppe von Zellen verbunden, die sich an der Mittellinie des ZNS befinden. Während der axonalen Musterbildung kommt den Mittellinienzellen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Kommissuren zu. Die segmentalen Kommissuren verbinden die auf jeder Seite des Embryos verlaufenden longitudinalen Konnektive miteinander. Unterteilt werden die segmentalen Ganglien in drei thorakale und acht abdominale Neuomere.

1.2 Die Entstehung der Mittellinie in *Drosophila*

1.2.1 Spezifizierung der Mittellinienvorläuferzellen

Da die Mittellinienzellen für die Bildung des Nervensystems eine funktionale Bedeutung haben, ist es notwendig, ihre Entstehung genau zu verstehen. Die Zellen der Mittellinie gehen aus dem Mesektoderm hervor, das sich im Blastoderm-Stadium zwischen dem präsumtiven Mesoderm und der Anlage des Neuroektoderms befindet (Poulson, 1950). Die Vorläuferzellen der Mittellinie werden schon während der frühen Entwicklung als separate Zellpopulation im Zentrum des ventralen Nervensystems gebildet (Crews *et al.*, 1998;

Thomas *et al.*, 1988). Während des zellulären Blastoderm-Stadiums wird die Anlage des Mesoderms jeweils von einer Reihe von Mittellinienvorläuferzellen flankiert. Diese beiden Reihen werden im Verlauf der Gastrulation an der ventralen Mittellinie zusammengebracht und fügen sich zu nur einer Reihe von Mittellinienvorläuferzellen zusammen. Es existieren insgesamt acht Mittellinienvorläuferzellen pro Segment (Klämbt *et al.*, 1991; Bossing & Technau, 1994). An der ventralen Mittellinie teilen sich die Mittellinienvorläuferzellen und wandern in das Innere des Embryos. Diese Zellen unterscheiden sich morphologisch von ihren Nachbarzellen und sind molekular durch die Expression des *bHLH*-Transkriptionsfaktors *single-minded (sim)* erkennbar, der als Master-Regulator wirkt und für die Entstehung der Mittellinie verantwortlich ist (Crews *et al.*, 1998). Der Verlust der SIM-Funktion hat ein Absterben aller Mittellinienzellen zur Folge, das sich in einem Kollaps der Axontrakte entlang der Mittellinie äußert (Thomas *et al.*, 1988). Bei einer ektopischen Expression von *sim* im Neuroektoderm hingegen nehmen alle Zellen das mesektodermale Schicksal an (Nambu *et al.*, 1991; Nambu *et al.*, 1990).

Die drei anterior gelegenen Zellen der acht Mittellinienvorläufer teilen sich einmal und bilden die Mittelliniengliazellen. Die restlichen Vorläuferzellen bilden die verschiedenen neuronalen Zellen der Mittellinie: die MP1-Neurone, zwei Interneurone, die sich lateral der Mittellinie befinden, und die ventralen ungepaarten medianen Neurone (VUM), ein Cluster von 3 Moto- und 3 Interneuronen (Bossing & Technau, 1994; Jacobs & Goodman, 1989a). Das Zellschicksal der Mittellinienzellen ist von der Position innerhalb des Segments abhängig, in der die Mittellinienzellen und ihre Neurone gebildet werden (Menne *et al.*, 1997). Eine Spezifizierung der anterioren und posterioren Mittellinienzellen erfolgt durch die Expression der Segmentierungsgene wie in Abb.1 angedeutet (Hummel *et al.*, 1999b).

1.2.2. Aufgabe der Mittellinienzellen

Wenn sich die NB des ZNS gebildet haben und spezifiziert sind, generieren sie Neurone, deren Axone schließlich ein komplexes axonales Geflecht bilden. Die kommissuralen Axone projizieren contralateral und müssen dabei die Mittellinie kreuzen. Die Wachstumskegel

dieser kommissuralen Axone migrieren auf die anterior gelegenen VUM-Neurone zu, um die posteriore Kommissur zu bilden. Kurz nachdem sich die posteriore Kommissur gebildet hat, wachsen die Axone der anterioren Kommissur auf die Mittellinie zu. Anteriore und posteriore Kommissur werden in unmittelbarer Nähe zueinander gebildet. Getrennt werden die beiden Kommissuren durch die anschließende Migration zweier Gliazellen zwischen anteriore und posteriore Kommissur (Klämbt *et al.*, 1991). Wird dieser Migrationsprozeß gestört, so kommt es zu einem „fusionierten Kommissuren“-Phänotyp, der in zwei Klassen unterteilt werden kann: der *pointed*-Gruppe und der *tramtrack*-Gruppe (Hummel *et al.*, 1999a). Die Gene dieser Gruppen sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Am Ende der Embryogenese kommt den Gliazellen noch eine weitere wichtige Funktion bei der Faszikulation der Axonbündel zu.

1.3 Axonale Wegfindung

Von Neuronen gehen verschiedene Fortsätze aus, die unterschiedlich lang sein können und funktionell spezialisiert sind. Dendritische Fortsätze leiten die Information zum Zellkörper, wo sie vom Axon an andere Zellen weitergeleitet wird. Während der neuronalen Entwicklung müssen Axone mit großer Präzision weite Strecken zurücklegen. Sowohl Axone als auch Dendriten erreichen durch gezielte Navigation ihren Bestimmungsort. Die Ausbildung einer bestimmten subzellulären Struktur, die man als Wachstumskegel bezeichnet, hilft den Axonen und Dendriten bei der Navigationsentscheidung. Der Wachstumskegel streckt zahlreiche Fortsätze aus, sogenannte Filopodien, zwischen denen sich abgeflachte Lamellipodien ausbilden. Durch die Kontakte, die die Filopodien mit anderen Zellen und mit der extrazellulären Matrix (ECM) ausbilden, wird die Fortbewegungsrichtung des Wachstumskegels beeinflusst. Dabei kommt es durch einen ständigen Auf- und Abbau von Aktinbündeln nahe der Spitze des Wachstumskegels zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts. Gelenkt wird der Wachstumskegel durch molekulare Signale aus der Umgebung, die ihn dazu bewegen, entweder in eine bestimmte Richtung weiterzuwachsen oder sich zurückzuziehen (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Damit der Wachstumskegel auf diese Signale

antworten kann, bildet er Rezeptoren auf seiner Oberfläche aus (Mueller, 1999), die das Signal ins Zellinnere weiterleiten. Vermutlich ist der Wachstumskegel durch Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und durch Veränderung des cAMP-Spiegels in der Lage, auf diese Signale zu antworten. *In vitro* führt ein unterschiedlicher Level an Ca^{2+} zu einer Verstärkung bzw. Abschwächung der Motilität des Wachstumskegels (Kater & Mills, 1991; Bandtlow *et al.*, 1993; Gu & Spitzer, 1995). Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Filopodien und Lamellipodien bewirkt in Abhängigkeit von zyklischen AMP (cAMP) eine direkte Umkehr des Wachstumskegels (Ming *et al.*, 1997; Zheng, 2000).

1.4 Mechanismen der axonalen Wegfindung

Das Verhalten des Wachstumskegels wird durch attraktive und repulsive Signale beeinflusst. Dabei unterscheidet man zwischen zwei Mechanismen der axonalen Wegfindung: Haptotaxis und Chemotaxis. Bei der Haptotaxis wird der Wachstumskegel durch die Ausbildung eines Adhäsionsgradienten gelenkt, auf den er in kontakt-abhängiger Weise reagiert: Durch repulsive bzw. attraktive Wegfindungssignale wird das direktionale Wachstum über kürzere Distanzen kontrolliert (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Diese Signale werden daher als „short range“-Faktoren bezeichnet.

Mittels kontakt-abhängiger Attraktion ist der Wachstumskegel beispielsweise in der Lage, mit anderen Nervenzellen in Kontakt zu treten. Pionierneurone, die als erste ihren Weg zum Zielort finden, dienen als Wegweiser für andere Axone. Sie generieren adhäsive Substrate auf ihrer Zelloberfläche, wodurch die neuronale Navigation für die folgenden Axone erleichtert wird.

Die Ausbildung eines diffusiblen Gradienten, der über weite Distanzen wirken kann, bezeichnet man als Chemotaxis. Die an der Bildung des Gradienten beteiligten Signalmoleküle bezeichnet man als „longe range“-Faktoren (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Nur das Zusammenspiel beider Wegfindungsmechanismen ermöglicht es dem Wachstumskegel, sein Ziel zu finden.

Um auf die vom Ziel ausgehenden Signalmoleküle antworten zu können, exprimiert der Wachstumskegel Rezeptoren auf seiner Zelloberfläche, die das Signal als attraktiv oder repulsiv interpretieren. Die Expression der axonalen Wegfindungsfaktoren ist in der Entwicklung oftmals dynamisch und erfolgt zu einer bestimmten Zeit an einem bestimmten Ort. Durch transkriptionelle Regulation der Signale und ihrer Rezeptoren wird deren Expression räumlich und zeitlich kontrolliert (Yu & Bargmann, 2001; Su *et al.*, 2000). Rezeptoren können jedoch nicht nur auf transkriptioneller Ebene reguliert werden, sondern auch auf posttranskriptionelle Weise (Yu & Bargmann, 2001).

1.5 Identifizierung molekularer Mechanismen bei der kommissuralen Musterbildung

Im Verlauf der Axogenese trifft das Axon auf intermediäre Ziele, die ihm als Wegweiser dienen. Die Mechanismen der axonalen Wegfindung sind bekannt, doch die molekularen Mechanismen, die hinter diesen Prozessen stecken, wurden erst in den vergangenen Jahren genauer analysiert. Ein Modellsystem, das sich zur Untersuchung axonaler Wegfindungsmechanismen eignet, ist die Mittellinie. Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten senden Neurone ihre Axone zur Mittellinie hin aus.

Mit Hilfe einer genetischen Analyse war es möglich, die Gene, die an der kommissuralen Musterbildung in *Drosophila* beteiligt sind, anhand ihrer Phänotypen zu klassifizieren (Hummel *et al.*, 1999a). Der Prozeß der Kommissurenbildung läßt sich in vier Schritte unterteilen, denen jeweils eine Gruppe von Genen zugeordnet werden kann (Abb. 1). In der ersten Gruppe befinden sich die Gene, die an der Bildung der Mittellinie des ZNS beteiligt sind. Die Spezifizierung der Mittellinienzellen erfolgt durch die Segmentierungsgene, der zweiten Gruppe von Genen, die an der Entwicklung der Kommissuren beteiligt sind. Nachdem die Zellen der Mittellinie determiniert wurden, werden von den Mittelliniengliazellen Signalmoleküle gebildet, die von spezifischen Rezeptoren des Wachstumskegels erkannt werden. In der letzten Gruppe kommen die Gene zum Tragen, die an der Trennung der Kommissuren beteiligt sind.

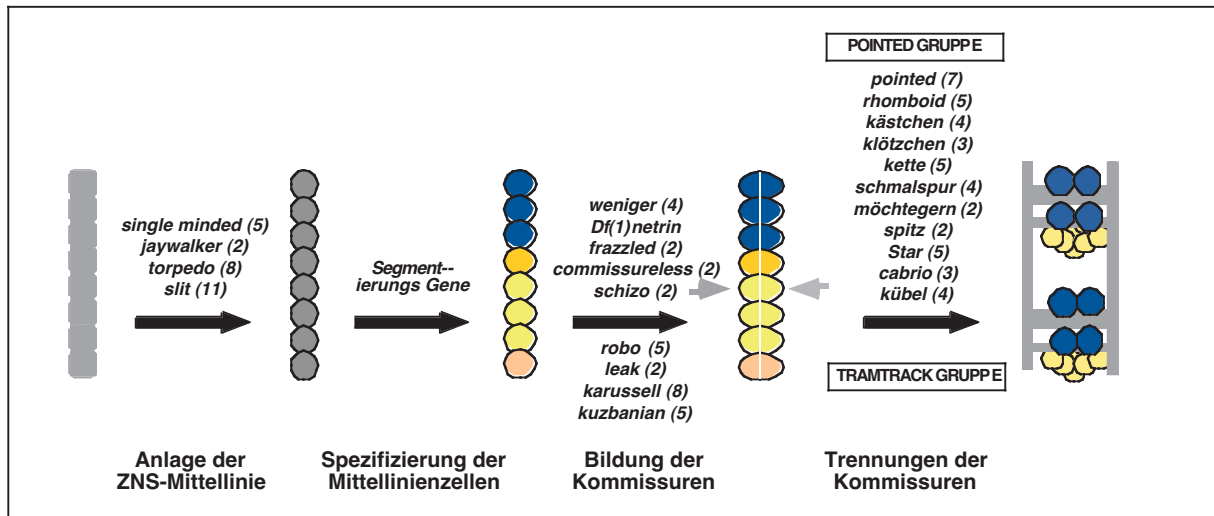


Abb.1 Gene, die an der Entwicklung der Kommissuren beteiligt sind. Die Bildung der Kommissuren erfolgt in vier Schritten. Die Gene *netrin* und *slit* werden von den Mittelliniengliazellen exprimiert und vermitteln Attraktion und Repulsion an der Mittellinie. Der Rezeptor für *netrin* wird von *frazzled* kodiert. An dem repulsiven Signalweg sind das Signalmolekül *slit*, der Rezeptor *robo* und die Gene *comm* und *kuzbanian* beteiligt.

1.5.1 Identifizierung von attraktiven Signalkomponenten

Das Gen *netrin* wird von den Zellen der Mittellinien exprimiert und ist in seiner Funktion evolutionär konserviert. Abhängig von dem jeweiligen Rezeptor können Netrine attraktiv oder repulsiv wirken. Netrin-abhängige Attraktion wird durch die Rezeptorfamilie DCC vermittelt. Zu dieser Familie gehört das *Drosophila* Gen *frazzled* (Kolodziej *et al.*, 1996), das *Caenorhabditis elegans* Gen *UNC-40* sowie *DCC* und *neogenin* aus Vertebraten (Yu & Bargmann, 2001). Neben dieser Rezeptorfamilie existiert noch eine zweite Netrin-Rezeptorfamilie, zu der das *C. elegans* und *Drosophila* Gen *UNC-5* (Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992; Keleman & Dickson, 2001) und die drei Vertebraten-Homologe *UNC5H1-H3* (Seeger & Beattie, 1999) gehören. Diese Rezeptorfamilie vermittelt im Gegensatz zu der DCC-Familie Repulsion.

Die cytoplasmatische Domäne von DCC enthält drei konservierte Domänen, die zwischen den Spezies stark konserviert sind und als P1-P3 bezeichnet werden. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor entsteht ein Multimerkomplex des DCC-Rezeptors über die

cytoplasmatische P3-Domäne (Giger & Kolodkin, 2001). Dies führt *in vitro* zu einer attraktiven Stimulation des Wachstumskegels. Die Dimerisierung von Rezeptoren ist ein zentrales Thema bei der Signalübertragung. *In vitro* kann ein attraktives Signal durch Heterodimerisierung des DCC-Rezeptors und des UNC5-Rezeptors in ein repulsives umgekehrt werden. Die P1-Domäne von DCC bindet dabei an das DCC-bindende Motiv (DB) von UNC-5 (Abb.2 c). UNC-5 allein ist ebenfalls in der Lage, Repulsion zu vermitteln. Genetische Untersuchungen in *Drosophila* lassen jedoch Unterschiede in dem durch DCC/UNC-5 und UNC-5 vermittelten Signal vermuten. Durch die Rezeptor-Komplexbildung von DCC/UNC-5 wird ein chemorepulsives „long range“-Signal vermittelt, wohingegen UNC-5 allein über kürzere Distanzen repulsiv wirkt (Keleman & Dickson, 2001).

1.5.2 Identifizierung repulsiver Signalkomponenten

Ebenfalls von den Zellen der Mittellinie wird das Gen *slit* (*sli*) exprimiert, das zum repulsiven System in *Drosophila* gehört. Genau wie der Netrin-Signalweg sind auch die Komponenten des Slit-Signalwegs in ihrer Funktion in Invertebraten und Vertebraten konserviert (Brose & Tessier-Lavigne, 2000).

Vermittelt wird die repulsive Aktivität von Slit durch die cytoplasmatischen Domänen CC0-CC3 des Slit-Rezeptors Roundabout (Robo). Es existieren drei Robo-Rezeptoren in *Drosophila*, die von den longitudinalen Axonen nach Kreuzen der Mittellinie in verschiedenen Kombinationen co-exprimiert werden (Simpson *et al.*, 2000a; Simpson *et al.*, 2000b; Rajagopalan *et al.*, 2000). Die durch Robo vermittelte Repulsion kann durch die Abelson Tyrosin-Kinase (ABL) antagonisiert werden, wahrscheinlich, indem sie die CC1-Domäne von Robo phosphoryliert (Bashaw *et al.*, 2000) (Abb.2 a). Das Substrat von ABL hingegen, Enabled (Ena), übt eine komplementäre Funktion aus (Bashaw *et al.*, 2000). Der Verlust von *ena* führt zu einer teilweisen Unterbrechung des Robo-Signals, was vermuten läßt, daß Ena die repulsive Wirkung von Robo verstärkt.

Wenn die Axone an der Mittellinie auf das repulsive Slit-Signal treffen, müssen sie in der Lage sein, die Mittellinie wieder zu verlassen. Genetische Analysen und

Überexpressionsstudien haben gezeigt, daß die Metalloproteinase *kuszbanian* (*kuz*) ebenfalls eine Rolle im Slit-Signalweg spielt, vermutlich durch proteolytische Aktivierung des Slit-Robo-Komplexes (Schimmelpfeng *et al.*, 2001).

Die kommissuralen Axone kreuzen die Mittellinie nur einmal, da sie durch die von Robo vermittelte Repulsion daran gehindert werden, erneut die Mittellinie zu kreuzen. *robo* RNA wird von Neuronen exprimiert, während diese die Mittellinie kreuzen, aber das Protein wird posttranskriptional durch das Transmembranprotein Commissureless (*Comm*) inaktiviert, bis das Axon die Mittellinie gekreuzt hat. Bei einem Funktionsverlust von *comm* können Axone die Mittellinie nicht mehr kreuzen (Seeger *et al.* 1993; Kidd *et al.*, 1998b). In wildtypischen Tieren wird das Robo Protein in kommissuralen Axonen in internen Vesikeln eingeschlossen (Kidd *et al.*, 1998a). *Comm* wird von den Mittelliniengliazellen exprimiert, nur dort kann Robo herunterreguliert werden. Da die kommissuralen Neurone *comm* nur in geringen Maßen exprimieren, nahm man bisher an, daß *Comm* von den Mittellinienzellen auf die kommissuralen Neurone übertragen wird, um dort Robo zu inaktivieren. Die Überexpression von *comm* in den Mittellinienzellen kann den *comm*-Phänotyp jedoch nicht retten. Eine neue Modellvorstellung geht davon aus, daß *comm* sowohl in neuronalen als auch in Mittelliniengliazellen benötigt wird (Georgiou & Tear, 2002). Möglicherweise wird es in Vesikeln an die Membran transportiert, um an der Zelloberfläche präsentiert zu werden (Keleman *et al.*, 2002).

In einer Studie von Stein & Tessier-Lavigne (2001) konnte gezeigt werden, daß der attraktive Netrin- und der repulsive Slit-Signalweg miteinander kommunizieren. Durch die Dimerisierung des Robo-Rezeptors mit der P3-Domäne des DCC-Rezeptors (Abb. 2 a und b) kann ein durch Netrin vermitteltes attraktives Signal inhibiert werden.

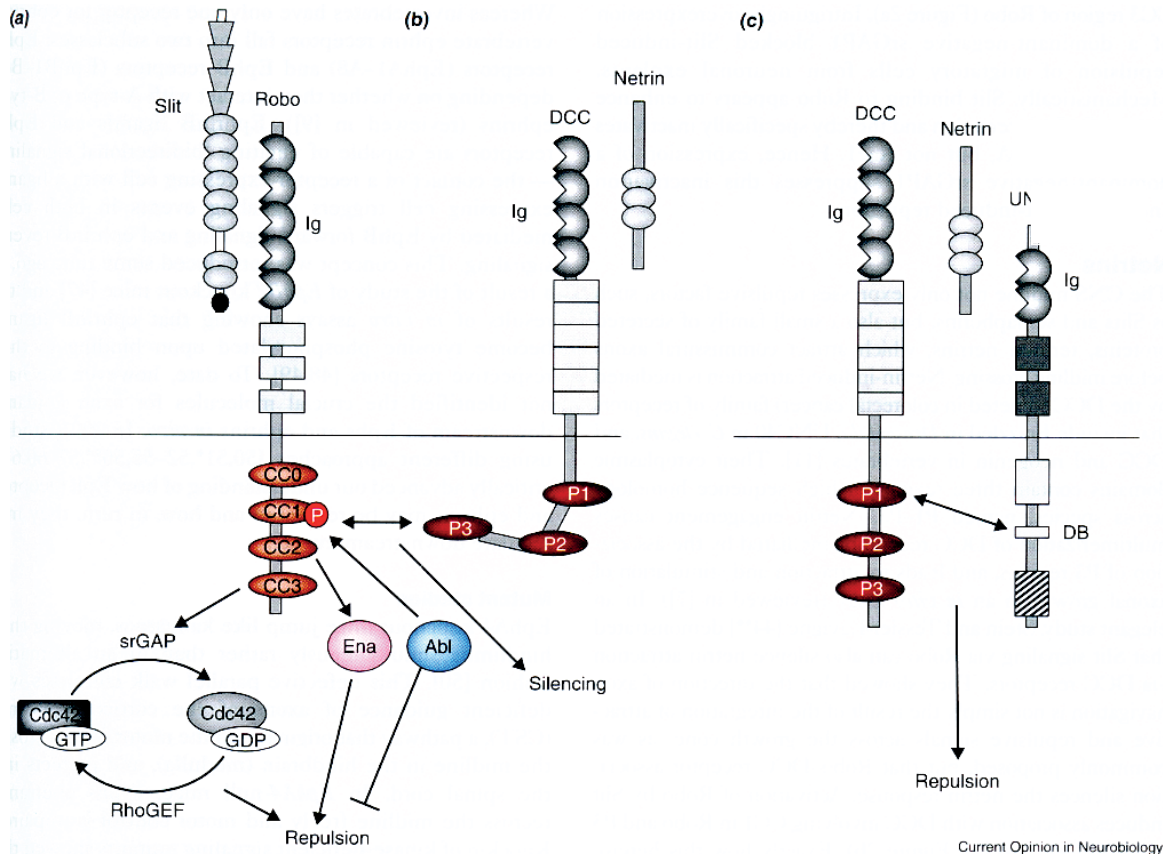


Abb.2 Signalmechanismen von Slit und Netrin durch ihre Rezeptoren. (a) Ena ist an der Repulsion von Robo beteiligt, indem es an die CC2-Domäne von Robo bindet. Antagonisiert wird Ena durch Phosphorylierung der CC1-Domäne durch die ABL Tyrosin-Kinase. Mittels slit-roboGAPs (srGAPs) werden Rho GEFs antagonisiert (siehe 1.7). Das auswachsende Axon zieht sich zurück. (b) Netrin bindet an den DCC-Rezeptor und vermittelt Attraktion. Wenn Slit und Netrin vorhanden sind, wird die durch Netrin vermittelte Attraktion durch Heteromerisierung der Rezeptoren eingestellt. Robo bindet dabei mit seiner CC1 Domäne an die P3-Domäne von DCC. (c) Durch Heteromerisierung der Netrin-Rezeptoren DCC und UNC5 wirkt Netrin repulsiv. (Nach Grunwald & Klein, 2002)

1.5.3 Identifizierung neuer Signalmoleküle, die an der Bildung der Kommissuren beteiligt sind

In einer saturierenden EMS-Mutagenese wurden zwei neue Gene identifiziert, die an der kommissuralen Musterbildung beteiligt sind, *schizo* und *weniger* (Hummel *et al.*, 1999b). Komplementationsanalysen haben gezeigt, daß *weniger* allelisch zu *elav* ist (Lammel, unveröffentl.). Das Gen *schizo* sollte im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden. Der kommissurale Phänotyp in *schizo*-mutanten Embryonen läßt vermuten, daß *schizo* eine zusätzliche Komponente der bekannten Signalwege an der Mittellinie darstellt oder einen neuen molekularen Wegfindungsmechanismus begründet.

1.6 Die Rolle der Endozytose während der axonalen Wegfindung

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, kommuniziert der Wachstumskegel mit seiner Umgebung mittels Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und das Signal in das Innere der Zelle leiten. Um die Aktivität von Membran-gebundenen Rezeptoren zu regulieren, gibt es mehrere Möglichkeiten. So kann z.B. über Endo-/Exozytose die Zahl der im Wachstumskegel vorhandenen Rezeptoren definiert werden. Auch für den Prozeß der axonalen Wegfindung ist die Endozytose wichtig. Neu synthetisierte Zellmembran wird durch den Endozytosezyklus vom Zellkörper in den Wachstumskegel transportiert (Dai & Sheetz, 1995). Auch Adhäsionsmoleküle werden in endozytosischen Vesikeln von einem Ende einer Zelle zum anderen gebracht (Bretscher *et al.*, 1996). Die Tatsache, daß Comm anscheinend nicht in den Mittelliniengliazellen benötigt wird, sondern in den kommissuralen Axonen wirkt (Georgiou & Tear, 2002), läßt vermuten, daß es direkt im Wachstumskegel an der Inaktivierung von Robo beteiligt ist. Nach neusten Erkenntnissen spielt der Endozytosezyklus eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulierung des Robo-Rezeptors. Expressionsstudien zeigen, daß Comm nur in kommissuralen Axonen exprimiert wird, und zwar zu genau dem Zeitpunkt, wenn die Kommissuren anfangen, sich zu bilden (Keleman *et al.*, 2002). In der Abwesenheit von Comm wird Robo über Vesikel effektiv an die Zellmembran transportiert. Bei einer co-Transfektion von *comm* und *robo* co-lokalisieren

beide Proteine in Vesikeln um den Golgi herum. Daraus läßt sich ableiten, daß Comm Robo in endosomale Vesikel sortiert (Keleman *et al.*, 2002) und der Rezeptor somit nicht mehr an die Plasmamembran (PM) transportiert werden kann (Abb. 3). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß für die Sortierung von Robo in die Endosomen die extrazelluläre und/oder die Transmembran-Domäne von Robo verantwortlich ist.

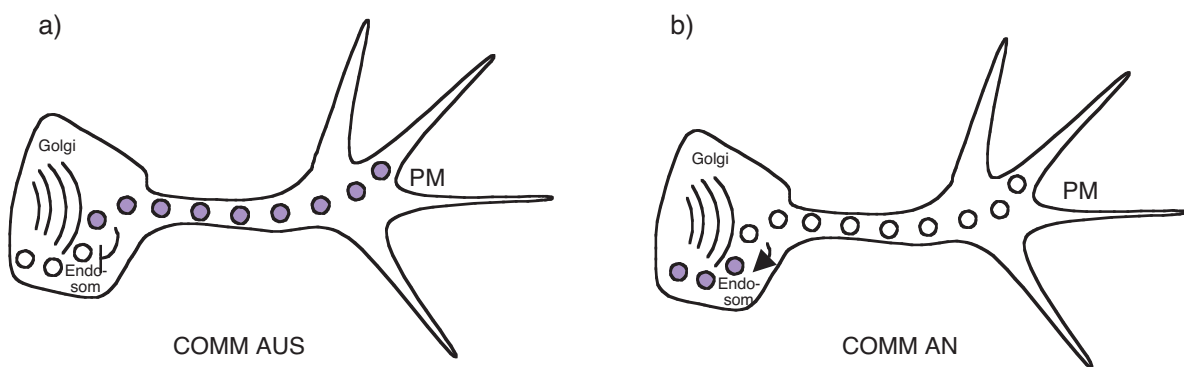


Abb. 3 Comm sortiert Robo in Endosome. Nach neuen Erkenntnissen wird *comm* in kommissuralen Axonen zusammen mit *robo* exprimiert. a) In longitudinalen Axonen, in denen *comm* nicht exprimiert wird, gelangt Robo in Vesikeln an die Plasmamembran (PM), so daß das Axon befähigt wird, auf das Slit-Signal zu antworten. b) In den Axonen, in denen Comm jedoch gebildet wird, sortiert es Robo in endosomale Vesikel und Robo wird nicht an die Zelloberfläche transportiert.

1.7 Die Rolle der Superfamilie der Ras GTPasen in der axonalen Wegfindung

Die von Netrin und Slit vermittelten Signale werden im Wachstumskegel in lokale Veränderungen des Aktincytoskeletts umgesetzt. Die Aktivierung von kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie ist eine zentrale Komponente in der Antwort des Wachstumskegels auf die Signale der axonalen Wegfindung. GTPasen zyklieren zwischen einem GTP-gebundenen aktiven Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Bekannte Regulatoren der Aktinorganisation sind die GTPasen der Rho-Familie (Nobes & Hall, 1995), zu denen Rac, Cdc42 und Rho gehören, die am Prozeß der axonalen Wegfindung beteiligt sind (Luo *et al.*, 1994; Steven *et al.*, 1998; Luo, 2000). Die Signalwege, die spezifische GTPasen mit

spezifischen Wachstumsrezeptoren verbinden, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Ein Modell besagt, daß attraktive Wachstumssignale Rac1 und Cdc42 aktivieren, wohingegen Rho bei einem repulsiven Signal aktiviert wird (Mueller, 1999; Hall, 1998). Rho GTPasen sind auch am Slit-Signalweg beteiligt (Abb. 2). Durch die Bindung von Slit an den Rezeptor werden die GTPasen Cdc42 und Rho inaktiviert, nicht jedoch Rac1.

Die Familie der Adenosin-Ribosylierungsfaktoren (ARF) GTPasen gehört ebenfalls zu der Superfamilie der Ras GTPasen. Ursprünglich wurden sie als Regulatoren des Vesikeltransports identifiziert. ARFs werden in drei Klassen unterteilt: Klasse I enthält ARF 1, 2 und 3, Klasse II beinhaltet ARF 4 und 5, und zu Klasse III gehört das am wenigsten konservierte ARF6. Neuere Studien lassen vermuten, daß ARFs auch an der Modulierung des Aktin-Cytoskeletts während der Veränderung der Zellmorphologie beteiligt sind (Radhakrishna & Donaldson, 1997; D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Song *et al.* 1998).

1.8 Die Rolle von Guanine-Nucleotid-Austauschfaktoren in der axonalen Wegfindung

Wie bereits erwähnt, sind Ras-verwandte GTPasen an der Regulation der Aktindynamik beteiligt und lassen sich in die Rezeptor-abhängigen Signalkaskaden bei der axonalen Wegfindung einordnen (Hall, 1998).

Es gibt drei Typen von Proteinen, die die Aktivität der GTPasen regulieren. An dem Austausch von GDP zu GTP sind Guanine-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beteiligt. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die endogene GTPase-Aktivität, und Guanine-Nucleotid-disassoziierte Inhibitoren (GDIs) assoziieren mit der GDP-gebundenen Form der GTPasen, um ihre Funktion zu inhibieren oder zu aktivieren (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997). In den letzten Jahren konnten einige Moleküle, die an der Aktivierung bzw. Inaktivierung von GTPasen beteiligt sind, identifiziert werden. So entdeckten Wong *et al.* (2001) eine neue Familie von GAPs, die im Slit-Robo-Signalweg beteiligt sind und mit der CC3-Region von Robo interagieren können (Abb.1a nach Grunwald & Klein, 2002). Sie werden daher auch Slit-Robo GAPs (srGAPs) genannt.

Eine Gruppe von GEFs spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der ARF GTPasen. Alle ARF GEFs besitzen eine Sec7-Domäne, ein Modul von ungefähr 200 Aminosäuren (aa), die den Austausch von GDP zu GTP an ARFs *in vitro* katalysiert. Man unterscheidet zwei Gruppen von ARF GEFs, die sich in ihrem Molekulargewicht und teilweise auch in ihrer Resistenz gegenüber dem aus Pilzen stammenden Metaboliten Brefeldin A (BFA), das die Aktivierung von ARF inhibiert, unterscheiden. Die Subfamilie der niedrig molekulargewichtigen ARF GEFs ist überwiegend resistent gegenüber BFA und spielt eine Rolle in der Remodellierung des Aktinzytoskeletts (Frank *et al.*, 1998). Aktiv ist diese GEF-Subfamilie, zu der ARNO/Cytohesin/GRP und EFA6 gehören, an der endosomalen Plasmamembran. Sie sind weiterhin an dem Signalweg der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3) (Klarlund *et al.*, 1997; Venkateswarlu & Cullen, 2000) und im Integrin-Signalweg (Geiger *et al.*, 2000) beteiligt. Die Mitglieder dieser Subfamilie besitzen alle eine Pleckstrin Homologie Domäne (PH), die durch Bindung spezifischer Polyphosphoinositide die Lokalisation der GEFs an die Membran vermittelt und eine angrenzende carboxyterminale polybasische Domäne, die mit der PH-Domäne ko-operiert und die Membranbindung verstärkt. Die Spezifität der ARF GEFs für die einzelnen ARFs ist noch nicht genau geklärt. ARNO, Cytohesin-1 und GRP1 katalysieren im wesentlichen den Austausch von ARFs der Klasse I. ARNO und GRP1 jedoch co-lokalisieren mit ARF6 und spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von ARF6. Für EFA6 ist die Situation klarer, es aktiviert ARF6 *in vitro* effizienter als ARF1 und ist an der Wiederverwendung der endosomalen PM und an der Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Franco *et al.*, 1999).

1.9 Ziel der Arbeit

Das Gen *schizo*, das in einer systematischen Mutagenese des dritten Chromosoms identifiziert wurde, zeigt eine Reduktion der kommissuralen Axone, was darauf hinweist, daß es an der Bildung der Kommissuren beteiligt ist. Das Ziel der Arbeit bestand in der detaillierten molekularen und genetischen Charakterisierung der Funktion von *schizo*. Die Charakterisierung der bereits vorhandenen *schizo*-Mutationen, die Induktion neuer *schizo*-Allele und die ektopische Expression der daraufhin isolierten *schizo*-cDNA sollten Aufschlüsse über die Rolle geben, die *schizo* im Verlauf der kommissuralen Musterbildung spielt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

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

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

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

2.1.2 Puffer, Medien, Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18g Agar in 500 ml H ₂ O lösen und autoklavieren. 10g Saccharose und 3 ml Eisessig in 300 ml H ₂ O hinzugeben und aufkochen.
Araldit	52 ml Araldit Cy 212 und 48 ml Araldit Hy 964 (Härter) 1 h mit einem Glasstab rühren. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe von 2 ml Araldit Dy 964 (Beschleuniger). Das Araldit wird in Spritzen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

BCIP-Lösungen	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid
Church-Hybridisierungslösung	0,5 M Church-Stammlösung (pH 7,2) 7% SDS
Church-Stammlösung	1 M Na ₂ HPO ₄ , mit H ₃ PO ₄ auf PH 7,2 einstellen
Church-Waschlösungen	40 mM Church-Stammlösung 1% SDS
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPEC- H ₂ O	0,1% (v/v) DEPEC 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, 18g Trockenhefe und 10 g Sojamehl hinzugeben, 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup hinzugeben, auf eine Temperatur von 60°C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 15 ml Nipagin-Lsg. (100 g Nipagin in 1l 70% EtHO) hinzugeben.
Heptan-Fix	400 µl 5% Formaldehyd in PBS 1:1 auffüllen, kräftig schütteln und nach Phasentrennung die gesättigte Heptanphase zur Fixierung verwenden.

Heptan-Kleber	Zerkleinertes Klebeband (Tesapack; Beiersdorf, Hamburg) wird in einer Weithalsflasche (500 ml) mit 150 ml Heptan überschichtet. Durch Schütteln (5 h) den Kleber in Heptan lösen. Überstand der Kleberlösung abgießen und für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Überstand dient als Heptan-Kleber.
Hoyer's Medium	50 ml H ₂ O und 30 g <i>Gummi arabicum</i> ü.N. rühren. 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben und verrühren.
Hybridisierungslösung	50% Formamid 5x SSC 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA 50 µg/ml Heparin 0,1% Tween
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA 1,5 µg Helper-DNA (pUC Δ2-3) (Laski <i>et al.</i> , 1986) 1 µl rote Lebensmittelfarbe 1,5 µl Injektionspuffer ad 15 µl H ₂ O
Injektionspuffer (10x)	1 ml PO ₄ -Puffer (pH 7,4) 50 mM KCl

LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Hefe-Extrakt 10 g NaCl
Lysepuffer	100 mM EDTA 250 mM NaCl 20 mM NaB ₄ O ₇ (pH 9,6)
Natriumhypochloritlösung	10-15% aktives Chlor (Chlorbleichlauge, Schindler & Co.) 1:1 mit Leitungswasser verdünnen
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCL (pH 9,5)
Osmiumfixan	50 µl 4%ige Osmium-Stammlösung 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) 4 µl 50% Glutaraldehyd
PBS (10x)	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCL pH 7,6

PBT	1x PBS 0,3% Triton X-100
RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem dd H ₂ O
SB-Medium	35 g Bacto Trypton 25g Bacto Hefe-Extrakt 5g NaCl ad 1l H ₂ O, pH 7,5 mit 10 N NaOH einstellen
SDS	10% Natriumdodecylsulfat-Lösung
SM-Puffer	10 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM 1M Tris/HCL (pH 7,5)
SquiB	10 mM 1M Tris (pH 8,2) 1 mM EDTA 25 mM NaCl, vor der Verwendung mit 200 µg/ml Proteinase K versetzen
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 8,2)
TBE	89 mM Tris/HCl (pH 8,2) 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,2) 1 mM EDTA
Toluidinblau-Färbelösung	1% Toluidinblau 1% Borax
Tris/HCl	1 M Tris Mit HCl auf den gewünschten pH-Wert einstellen
X-Gal-Färbelösung	10 mM PO_4 (pH 7,2) 150 mM NaCl 1 mM MgCl_2 3 mM $\text{K}_4[\text{FeII}(\text{CN})_6]$ 3 mM $\text{K}_3[\text{FeII}(\text{CN})_6]$ 0,3% Triton X-100
X-Gal Lösung	10% X-Gal in DMSO

2.1.3 Bakterienstämme und Vektoren

2.1.3.1 Bakterienstämme

- XL1-blue (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- SCS-100 (Stratagene, Heidelberg)
- SURE cells (Stratagene, Heidelberg)

2.1.3.2 Vektoren

- pBluescript SK+ (Stratagene, Heidelberg)
- pUAST
- pGEM T-Easy (Promega)

2.1.4 Verwendete Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

BP102	Maus, monoklonal	1:30-1:50	Patel & Goodman, unveröffentl.
22C10	Maus, monoklonal	1:30-1:50	Fujita <i>et al.</i> , 1982
1D4 (anti-FasII)	Maus, monoklonal	1:5-1:10	van Vector <i>et al.</i> , 1993
C555.6D (anti-Slit)	Maus, monoklonal	1:50	Rothberg <i>et al.</i> , 1990
anti-ELAV	Ratte, monoklonal	1:10	Rubin, unveröffentl.
2D5 (anti-FAS III)	Maus, monoklonal	1:10	Patel <i>et al.</i> , 1987
anti-REPO	Maus, monoklonal	1:10	Jones, unveröffentl.
anti- β -Galaktosidase	Kaninchen, polyklonal	1:5000	Cappel
FITC Ziege anti Peroxidase		1:200	Dianova GmbH

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus GmbH	HRP-gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege-anti-Maus GmbH	AP-gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen GmbH	HRP-gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen GmbH	AP-gekoppelt	1:1000	Dianova
anti-DIG	AP-gekoppelt	1:1000	La Roche

Für die konfokale Mikroskopie wurden sekundäre polyklonale Antikörper Cy3 und Cy5 der Firma Dianova verwendet, die entweder gegen Immunglobuline aus Maus oder Kaninchen gerichtet waren. Der gekoppelte Farbstoff Cy3 (Indocarbocyanin) wird bei 550 nm maximal angeregt; das Emissionsmaximum liegt bei 570 nm. Cy5 (Indodicarbocyanin) weist bei einer maximalen Absorption (650 nm) eine maximale Lichtemission bei 670 nm auf. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Für die Untersuchungen wurde das konfokale Mikroskop der Firma Leica, Modell TCS NT verwendet. Zur Analyse wurden die Embryonen in Fluoromount-G (Biozol) eingebettet. Die Präparate können dunkel bei 4°C vier bis fünf Wochen gelagert werden, ohne daß der Farbstoff ausbleicht.

2.1.5 Fliegenstämme

2.1.5.1 Deletionsmutationen

Die meisten der verwendeten Defizienzen wurden aus dem Bloomington Stock Center, Bloomington, Indiana, USA bezogen.

Drittschromosomale Deletionsmutationen

Defizienzen	Bruchpunkte	Referenz
Df(3L) vin6	68C8-11; 69B4-5	Kaufman
Df(3L) fzME21	70D2-3; 71E4-5	Gridham
Df(3L) fzGF3b	70C1-2; 70D4-5	Gridham
Df(3L) D-5rv6	70C7-8; 70D5-6 77E5-78 A2; 78A7-B1	Carpenter
Df(3L) ME24	73C3-D7; 81	Carpenter
Df(3L) ME107	77F3; 78C 8-9	Deak
l(3) 78Aa ¹	78	Carpenter
l(3)78Ab ¹	78	Carpenter
l(3)78Ac ¹	78	Carpenter
Df(3L) 31A	78A; 78E	Pattatucci
Df(3L) Pc-MK	78A2; 78C8-9	Bloomington
Df(3L) ME14	78A2; 78B1	Carpenter
Df(3L) Pc-9a	78A3-4; 78D2-3	Carpenter
Df(3L) ME178	78A7-B1; het	Carpenter
Df(3L) Pc-cp2	78B1-2; 78D	Hartmann <i>et al.</i> , 1997
Df(3L) Pc-12h	78B3-C1; 78D4	Carpenter
Df(3L) Pc101	78C	Carpenter
Eip78C ^{A464}	78C1-2	Carpenter
Z389	78C3	Nüsslein-Volhard
Df(3L) Pc-2q	78C5-6; 78E3-79A1	Deak
Df(3R) ME15	81F3-6; 82F5-7	Carpenter
Df(3R) 6-7	82D3-8; 83F	Wasserman
Df(3R) Tp110	83C1-2; 84B1-2	Kaufman
Df(3R) Scr	84A1-2; 84B1-2	Kaufman
Df(3R) D6	84D2-3; 84F13-16	Kaufman
Df(3R) p712	84D4-6; 85D6	Kaufman
Df(3R) p-XT103	85A2; 85C1-2	Kaufman
Df(3R) by10	85D8-12; 85E7-F1	Kaufman
Df(3R) by62	85D11-14; 85F16	Kaufman
Df(3R) M-Kx1	86C1; 87B1-5	Gridham
Df(3R) C4	89E; 90A	Denell

2.1.5.2 P-Element-Insertionen

Linie	Insertion	Referenz
P{hsneo}123	78A	Cooley & Spradling
l(3)rK760	78A1-2	Rubin
l(3)L7062	78A2-3	Laughon
l(3)L5541	78A5-6	Laughon
l(3)3	78	Carpenter
l(3)07615	78C1-2	Spradling
l(3)j1B10	78C5-6	BGDP
l(3)j2C4	78C7-9	BGDP
l(3)00534	78D1-2	Spradling
P{PZ} bet	78D1-8	Wasserman

2.1.5.3 Balancer-Chromosomen

Balancer	Chromosom	P[lacZ]	Referenz
FM7c	X-Chromosom	P[ry, ftz-lacZ]	Hiromi, unveröffentl.
CyO ^{bb}	2. Chromosom	P[ry, elav-lacZ]	Klämbt, unveröffentl.
TM3, Sb	3. Chromosom		Lindsley & Zinn, 1992
TM3 ^{bb} , Sb	3. Chromosom	P[ry, elav-lacZ]	Klämbt, unveröffentl.
TM6 ^{bb} , Tb	3. Chromosom	P[ry, Ubx-lacZ]	Vässin, unveröffentl.
CyO/Sp; TM2/MKRS	2. Chromosom 3. Chromosom		Klämbt, unveröffentl.
CyO ^{bb} /Sp; TM2/TM6 ^{bb}	2. Chromosom 3. Chromosom	P[ry, elav-lacZ] P[ry, Ubx-lacZ]	Klämbt, unveröffentl.

2.1.5.4 Translokationen und Duplikationen

Translokation	Lokalisation	Referenz
T(2;3) ME21	h38R-h46; 78A33-B4	Carpenter
T(3;4) 11d	78A5-6; h59-h61	Carpenter

2.1.5.5 Verwendete GAL4-Treiber-Linien

GAL4-Treiber-Linien	Expressionsmuster	Referenz
<i>rho-GAL4</i> (511)	Homozygot vitale zweitchromosomale GAL4-Linie, erlaubt Expression im <i>rhomboid</i> -Muster	<i>Ip & Levine, unveröffentl.</i>
<i>sca-GAL4</i> (537)	Homozygot letale drittchromosomale GAL4-Linie, erlaubt Expression im <i>scrabrous</i> -Muster	(Klaes <i>et al.</i> , 1994)
<i>simGAL4/CyO</i> ; <i>simGAL4/simGAL4</i>	<i>simGAL4</i> -Treiber-Linie, erlaubt Expression in den Zellen der Mittellinie	(Scholz <i>et al.</i> , 1997)
<i>K24 (hs-sev-GAL4)</i>	<i>heat-shock</i> -Promotor- <i>sev</i> -Promotor-GAL4	Basler, unveröffentl.
<i>dpp-GAL4</i>	Homozygot letale drittchromosomale GAL4-Linie, erlaubt Expression im <i>decapentaplastic</i> -Muster	Morimura <i>et al.</i> , 1996
<i>slit-GAL4</i>	Zweitchromosomale GAL4-Linie, erlaubt Expression in den Zellen der Mittellinie	Klämbt <i>et al.</i> , 1996
<i>GMR-GAL4</i>	Glass Multimer Reporter: Zweitchromosomale GAL4-Linie, erlaubt Expression im Auge	Freeman, unveröffentl.
<i>ey-GAL4</i>	Zweitchromosomale GAL4-Linie, erlaubt Expression im <i>eyless</i> -Muster	<i>Gehring</i>
<i>da-GAL4</i>	Drittchromosomale GAL4-Insertion, erlaubt Expression im <i>daughterless</i> -Muster	Wodarz <i>et al.</i> , 1995

2.1.5.6 Verwendete UAS-Effektor-Linien

UAS-Effektor-Linie	Lokalisation	Referenz
<i>UAS-schizo</i>	2. und 3. Chromosom	diese Arbeit
<i>UAS Dcdc VI2</i>	3. Chromosom	Luo <i>et al.</i> , 1994
<i>UAS netrin B</i>	3. Chromosom	Mitchell <i>et al.</i> , 1996
<i>UAS lac Z II</i>	2. Chromosom	Bloomington
<i>UAS Arf</i>	3. Chromosom	diese Arbeit
<i>UAS 763</i>	3. Chromosom	diese Arbeit

2.1.5.7 Enhancer-Trap-Linien

Linie	Expressionsmuster	Referenz
<i>AA142</i>	ML-Gliazellen	Klämbt <i>et al.</i> , 1991
<i>dpplacZ</i>	<i>decapentaplagic</i> -Muster	
<i>emslacZ</i>	<i>empty spiracle</i> -Muster	Hartmann <i>et al.</i> , 2000

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Fliegenzucht

Die Fliegenstämme wurden auf Futtermedium in Standard-Plastiktöpfen bei 25°C gehalten, soweit keine andere Zuchttemperatur angegeben ist. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen (10 h nach Verlassen des Pupariums bei 18°C) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.1.2 Sammeln von Embryonen

Fliegen wurden in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das dann mit einer Apfelsaft-Agarplatte, auf der sich ein Tropfen frisch angerührte Bäckerhefe befindet, verschlossen wurde. Die Apfelsaft-Agarplatten müssen alle 12 h gewechselt werden und können höchstens 2 Tage vor der Fixierung bei 4°C gelagert werden.

2.2.1.3 Keimbahntransformation

Es werden in halbstündigen Abständen Embryonen von w^8 -Fliegen gesammelt, mit einem Pinsel in ein Siebchen überführt und für 3 min in Natriumhypochloritlösung dechorionisiert. Anschließend unter fließendem Wasser 3 min und 10 min in einem Schälchen waschen. Die

dechorionisierten Embryonen werden auf einen Agarstreifen aufgereiht und so ausgerichtet, daß die Microphyle nach außen zeigt. Die so ausgerichteten Embryonen werden auf ein Deckgläschen überführt, das mit Heptan-Kleber beschichtet ist, so daß sie dort fixiert werden. Danach läßt man die Embryonen vor dem Injizieren noch 5-15 min trocknen. Der geeignete Trocknungszustand ist dann erreicht, wenn es beim Einstechen der Nadel zur Faltenbildung kommt.

Das Deckgläschen wird auf einen Objektträger gelegt und die Embryonen mit Voltalef-10S-Öl überschichtet und injiziert.

2.2.1.4 DNA-Injektion

Zur Injektion werden die Injektionsnadeln der Firma Eppendorf (Nr. 5242) verwendet. Diese werden zuvor in einem spitzen Winkel von 30° angeschliffen, mit dem Injektions-Mix beladen und am Mikromanipulator (Leitz) befestigt. Die Nadel wird auf gleiche Höhe der Embryonen gebracht und in das posteriore Ende der Embryonen wird durch Bewegung des Objektisches mit Hilfe des luftgetriebenen Mikroinjektions-Systems (Eppendorf) der Injektionsmix injiziert. Die Injektion kann durch den roten Farbstoff im Injektions-Mix kontrolliert werden. Es wird nur in Embryonen injiziert, die sich im syntialen Blastoderm-Stadium befinden, ältere Embryonen werden abgetötet. Anschließend wird das Deckgläschen mit den Embryonen in eine kleine Schale überführt, mit Voltalef-3S-Öl überschichtet und bei 18°C bis zum Schlüpfen der Larven aufbewahrt. Die geschlüpften Larven werden dann in ein Futterröhrchen überführt und auf 25°C zur Weiterentwicklung gestellt.

2.2.1.5 Selektion von transgenen Fliegen

Die geschlüpften Fliegen werden gegen Doppelbalancer-Fliegen (Sp/CyO; TM2/MKRS) ausgekreuzt. Tiere, in die sich das injizierte Konstrukt integriert hat, sind in der folgenden Generation an ihren roten Augen zu erkennen, da nur sie das w^+ - Gen tragen. Die Intensität der Augenfarbe kann je nach Insertionsort variieren.

2.2.1.6 Bestimmung des Insertionsortes

Zur Bestimmung der Lokalisation des Transgens werden die rotäugigen Tiere erneut gegen Doppelbalancer ausgekreuzt. Die Segregation der w^+ -Insertion in Bezug auf die vier dominanten Marker erlaubt in der F2-Generation die Lokalisation der P-Insertion.

2.2.2 Mutagenesen

2.2.2.1 $\Delta 2$ -3-Reversionsmutagenese

Zur Reversion einer P-Element-Insertion wurde das $\Delta 2$ -3-Chromosom eingekreuzt, das ein stabil integriertes P-Element mit hoher Transposase-Aktivität enthält (Robertson *et al.*, 1988) und einen dominanten Marker trägt (*Ki*). Wie schon zuvor bei der Keimbahntransformation beschrieben, trägt der P-Element-Vektor entweder das *white*- oder das *rosy*-Gen als Augenmarker. Die Reversionsmutagenese muß daher in einem *white*⁻ - oder *rosy*⁻-Hintergrund durchgeführt werden, um die Exzision des P-Element-Vektors sichtbar zu machen. Zunächst werden jungfräuliche Weibchen des betreffenden Stammes mit Männchen des $\Delta 2$ -3 *Ki p*-Stammes verkreuzt. Die männlichen Nachkommen, die sowohl die P-Element-Insertion als auch das $\Delta 2$ -3-Chromosom tragen, werden mit weiblichen Tieren eines Balancer-Stammes verkreuzt. In der F3-Generation sind die Tiere, in denen eine Exzision stattgefunden hat, an dem Verlust des Augenmarkers zu erkennen. Es ist dabei darauf zu achten, daß diese Tiere nicht mehr das $\Delta 2$ -3-Chromosom tragen. Durch Rückkreuzung mit dem ursprünglichen Ausgangsstamm wird getestet, ob die durch die Insertion des P-Elements induzierte Letalität aufgehoben ist. Dies ist nur möglich, wenn es zu einer exakten Exzision des P-Elements kommt. Als Beispiel wurde das Kreuzungsschema für die Reversion der l(3)3-Insertion aufgeführt.

Kreuzungsschema:

$\begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array} \begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array}$	$\Delta 2-3 \text{ Ki } p^p / \Delta 2-3 \text{ Ki } p^p$	x	$1(3)3 / \text{TM}3, \text{ry} / \text{ry}$	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ \text{♂} \end{array}$	
$\begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array} \begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array}$	$\text{P}149 / \text{TM}3, \text{ry}^-$	x	$1(3)3 / \Delta 2-3 \text{ Ki } p^p$	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ \text{♂} \end{array}$	Einzelkreuzungen
$\begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array} \begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array}$	$\text{TM}6^{\text{bb}} / \text{TM}3^{\text{bb}}$	x	$\Delta 1(3)3 / \text{TM}3 \text{ ry}^-$	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ \text{♂} \end{array}$	Einzelkreuzungen
$\begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array} \begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{†} \end{array}$	$\Delta 1(3)3 / \text{TM}6^{\text{bb}}$	x	$\text{schizo}^{\text{U112}} / \text{TM}3$	$\begin{array}{c} \text{♂} \\ \text{♂} \end{array}$	Testkreuzungen

2.2.2.2 $\Delta 2-3$ -Transposonexzisionsmutagenese

Bei der Transposase-induzierten Reversion von P-Element-Insertionen kommt es nicht nur zu einer präzisen Exzision des P-Elements, sondern auch zu einer unpräzisen Exzision (Daniels *et al.*, 1985), wodurch es zur Deletion der umliegenden Bereiche kommt. Eine Exzisionsmutagenese wurde unter anderem zur Aufdeckung des *schizo*-Lokus durchgeführt mit den Insertionslinien 1(3)L7062, EP(3)3375 und 1(3)L4451. Wie schon unter 2.2.2.1 beschrieben, wurde durch Einkreuzen des $\Delta 2-3 \text{ Ki } p$ -Chromosoms eine Mobilisierung der P-Element-Insertion hervorgerufen. Transheterozygote Männchen aus der F1-Generation wurden mit Weibchen eines *white*⁻-Balancer-Stammes gekreuzt. In der F2-Generation wurden dann weißäugige Männchen gesammelt, die das $\Delta 2-3 \text{ Ki } p$ -Chromosom nicht mehr tragen. In diesen Tieren hat eine Exzision stattgefunden. Um die Isolierung klonal verwandter Mutationen zu vermeiden, wurden Einzelkreuzungen angesetzt. Die erhaltenen Tiere wurden etabliert und gegen die beiden *schizo*-Allele auf Letalität hin getestet.

2.2.2.3 „Local Hops“

Durch die Mobilisierung eines P-Elements wie unter 2.2.2.1 beschrieben, können auch neue Mutationen durch die Insertion des P-Elements an einem anderen Insertionsort entstehen. P-

Elemente zeigen die Tendenz, nach Transposase-induzierter Exzision in benachbarten Regionen zu re-inserieren (Zhang & Spradling, 1993).

Um weitere *schizo*-Allele zu generieren, wurden neben der unter 2.2.2.2 beschriebenen Exzisionsmutagenese auch „Local Hops“ induziert. Das Kreuzungsschema ähnelt dabei dem der Exzisionsmutagenese. In der F3-Generation selektioniert man jedoch nicht auf Verlust des Augenmarkers, sondern achtet auf eine veränderte Expressionsstärke des Augenmarkers (*white*⁺). Die generierten Insertionen wurden etabliert und gegen die beiden *schizo*-Allele auf Letalität hin getestet.

Kreuzungsschema:

♀ ♀	l(3)L07615 /TM3, Ser	x	$\Delta 2-3 Ki p^p$ ♂♂
♀ ♀	w/w; TM3/TM6	x	l(3)L07615 / $\Delta 2-3 Ki p^p$ ♂
♀ ♀	w/w; TM3 ^{bb} /TM6 ^{bb}	x	P (local hop) /TM6 ♂
♀ ♀	P(local hop) /TM3 ^{bb}	x	<i>schizo</i> ^{U112} /TM3 bzw. <i>schizo</i> ^{C1-028} /TM6 ♂

2.2.2.4 Herstellung von Rekombinanten

Die Herstellung von Rekombinanten erfolgte nach standard-genetischen Methoden (Ashburner, 1989).

In dieser Arbeit hergestellte Rekombinanten:

Mutante	Linie	Rekombinante
<i>schizo</i> ^{C1-028} /TM6	<i>sliGAL4</i> 3. Chromosom	<i>sliGAL4 schizo</i> ^{C1-028} /TM3 ^{bb}
<i>schizo</i> ^{C1-028} /TM6	<i>simGAL4</i> 2./3. Chromosom	<i>simGAL4 schizo</i> ^{C1-028} /TM3 ^{bb}
<i>schizo</i> ^{C1-028} /TM6	<i>UASnetrinB</i> 3. Chromosom	<i>UASnetrinB schizo</i> ^{C1-028} /TM3 ^{bb}
<i>schizo</i> ^{C1-028} /TM6	<i>UAScdc42</i> ^{VR12} 3. Chromosom	<i>UAScdc42</i> ^{VR12} <i>schizo</i> ^{C1-028} /TM3 ^{bb}
<i>schizo</i> ^{C1-028} /TM6	<i>Sema2b-τmyc</i> 3. Chromosom	<i>Sema2b-τmyc schizo</i> ^{C1-028} /TM3 ^{bb}

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 whole mount-Antikörperfärbung von *Drosophila*-Embryonen

- Embryonen werden von der Ablageplatte in multiwell-Platten (MWP) gewaschen
- Dechorionisierung der Embryonen durch 5% NaOCl für 3-5 min
- Embryonen werden mehrmals in Wasser gewaschen und auf Apura abgetropft
- Überführung der MWP in Heptan
- mit einer Pasteurpipette werden die Embryonen mit dem Heptan in ein 5 ml-Glasröhrchen überführt
- Fixierung der Embryonen erfolgt in Heptan/PBS (1:1) in 4% Formaldehyd für 20 min auf dem Taumler
- Devitellinisieren der Embryonen durch Austauschen der wäßrigen PBS-Phase gegen 2 ml Methanol und kräftiges Schütteln

- Abnahme der organischen Heptanphase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln
- Abnahme des Methanols und zweimaliges Waschen mit Ethanol
- die Embryonen können bei -20°C aufbewahrt oder sofort weiterbehandelt werden
- Embryonen 3x kurz in PBT rehydrieren
- 3x 15 min waschen in PBT/0,5% BSA
- Inkubation des primären Antikörpers bei 4°C in geeigneter Verdünnung in PBT/BSA ü.N.
- 3x kurz in PBT waschen, 3x 15 min in PBT auf dem Taumler waschen
- Inkubation des sekundären Antikörpers in geeigneter Verdünnung bei RT in PBT für 2-3 h
- antikörperspezifische Nachweisreaktion

2.2.3.2 Nachweisreaktionen

2.2.3.2.1 AP-Färbung

- Embryonen in NBT-Puffer waschen
- anschließend Embryonen in NBT-Puffer versetzt mit 4,5 µl/ml NBT-Lösung und 3,5 µl/ml BCIP inkubieren
- Färbereaktion unter dem Binokular kontrollieren und mit PBT nach ca. 5-10 min abstoppen
- 3x kurz mit PBT waschen
- 3x 20 min mit PBT auf dem Taumler bei RT waschen
- Embryonen in 70% Glycerin überführen

2.2.3.2.2 HRP-Färbung

- Embryonen werden in 0,3 mg/ml DAB-Lösung und 2 µl/ml H₂O₂ gefärbt
- Stoppen der Färbereaktion in PBT nach 5-10 min, wenn Färbung erfolgt ist
- 3x kurz mit PBT waschen
- 3x 20 min mit PBT auf dem Taumler bei RT waschen
- in 70% Glycerin überführen

2.2.3.2.3 Antikörperfärbung mit dem ABC-Kit

Zur Verstärkung des Signals wurde für einige Färbungen das *ABC-Elite Kit* (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) nach folgendem Protokoll benutzt:

Fixierung und Inkubation des primären Antikörpers erfolgten wie in 2.2.3.1

Nach der Inkubation des Primärantikörpers ü.N. wurde 3x kurz und 3x 20 min mit PBT gewaschen. Die Inkubation mit präabsorbiertem Sekundärantikörper aus dem Kit in der Verdünnung 1:5000 erfolgte 2 h bei RT.

- 4x 10 min mit PBT waschen, nach dem ersten Waschen Lösung A (10 μ l) und Lösung B (10 μ l) mit 500 μ l PBT mischen und 30 min „taumeln“
- Inkubation mit A+B+PBT für 30-60 min
- 4x 5 min mit PBT waschen
- die Nachweisreaktion erfolgte wie in 2.2.3.2.2

2.2.3.2.4 X-Gal-Färbung

- Erwärmung der X-Gal-Färbelösung auf 65°C
- Zugabe von 1:50 (v/v) einer 10% X-Gal-Lösung in DMSO
- Inkubation der Embryonen bei 37°C für 2-4 h
- Abstoppen der Färbereaktion durch 3x Waschen mit PBT auf dem Taumler

2.2.3.3 Präabsorption des anti- β -Galaktosidase Antikörpers

- bereits fixierte Embryonen werden 3x kurz und 3x 15 min mit PBT gewaschen
- 1 h inkubiert in 10% Ziegen Serum/PBT
- Überstand wird abgenommen und Embryonen werden mit dem β -Galaktosidase AK (1:500) in 10% Ziegen Serum/PBT ü.N. inkubiert
- Überstand sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren
- in einer Verdünnung von 1:10 einsetzen

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

- Embryonen werden wie unter 2.2.3.1 behandelt und in 8% Fixativ/PBS für 30 min auf dem Taumler fixiert
- die untere Phase wird abgenommen und Embryonen durch Zugabe von 2 ml Methanol unter kräftigem Schütteln devitellinisiert
- Abnahme der oberen Phase und Austauschen gegen Methanol

- Abnahme des Methanols und 2x waschen mit Ethanol
- Embryonen können bei -20°C gelagert werden
- Embryonen durch 3x Waschen in PBT rehydrieren
- währenddessen Wasser aufkochen, abkühlen lassen und Embryonen 6 min in dem nicht mehr kochenden Wasser inkubieren
- Embryonen auf Eis stellen und mit PBT waschen
- Postfixierung in 8% Formaldehyd/PBT für 15 min
- 5x 2 min mit PBT waschen
- kurzes Waschen mit PBT/Hybridisierungslösung im Verhältnis 1:1
- kurzes Waschen mit Hybridisierungslösung
- Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung für 60 min bei 55°C
- 2 μl markierte Probe in 28 μl Hybridisierungslösung 1 min aufkochen
- Zugabe der denaturierten RNA-Probe zur Hybridisierungslösung
- Inkubation bei 55°C ü.N.
- 1x 20 min mit Hybridisierungslösung waschen bei 55°C
- 1x 20 min in PBT/Hybridisierungslösung waschen bei 55°C im Verhältnis 1:2
- 5x 20 min waschen bei 55°C in PBT
- 1x 20 min waschen bei RT
- Inkubation mit anti-Digoxigenin Antikörper 1:1000 für 1h
- 5x 10 min waschen mit PBT
- 1x 10 min waschen mit NBT-Puffer
- Embryonen werden in 4,5 $\mu\text{l/ml}$ NBT-Lösung und 3,5 $\mu\text{l/ml}$ BICIP in NBT-Puffer inkubiert
- Stoppen der Färbereaktion in PBT
- 3x kurz mit PBT waschen, 3x 20 min mit PBT bei RT auf dem Taumler waschen

2.2.3.5 Einbetten von Embryonen nach *in situ*-Hybridisierung

- Entwässern der Embryonen in einer Alkoholreihe: 50%, 70%, 90%, 95%, 100% Ethanol
- Embryonen auf einen Objekträger in 1:1 Kanadabalsam/Methylsalicylat überführen und Deckgläschen auflegen

2.2.3.6 Simultan-Fixierung von adulten Augen

Der Kopf der Fliege wird mittels einer Schickklinge (Plano) vom Körper abgetrennt und median gespalten. Die Augen werden in einem Gemisch aus 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 4 µl 50%igem Glutaraldehyd auf Eis überführt. Die Simultan-Fixierung der Augen erfolgt für 30 min durch Zugabe von 50 µl Osmium (Osmiumstammlösung 4%ig). Nach Entfernen der Fixierlösung wird zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend werden die Augen in 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 50µl Osmium (Osmiumstammlösung 4%ig) für zwei Stunden auf Eis nachfixiert. Gewaschen wird einmal kurz mit H₂O 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. Man arbeitet bis zum Propylenoxid auf Eis, danach bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Augen in ein Propylenoxid-Araldit-Gemisch (1:1) überführt und dort mindestens für 6 h (besser ü.N.) belassen (Gefäß so abdichten, daß das Propylenoxid langsam entweichen kann).

2.2.3.7 Einbettung von adulten Augen

Mit Präpariernadeln werden die fixierten Augen auf den Boden einer mit Araldit gefüllten Einbettungsform (Serva) überführt. Die Augen werden so ausgerichtet, daß die zu schneidende Fläche nah an dem äußeren Rand der Form zu liegen kommt. Das Auge sollte möglichst am Boden der Form liegen, um die Ausrichtung der Schnittfläche während des Aushärtens zu stabilisieren. Das Aushärten des Araldits erfolgt für 48 h bei 60°C.

2.2.3.8 Herstellung von Gelatine-beschichteten Objektträgern

Objektträger werden gründlich unter fließendem Wasser gespült und anschließend zweimal in 90%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen werden sie kurz in 0,5%ige Gelatine getaucht, erneut getrocknet und im Präparatekasten staubfrei aufbewahrt.

2.2.3.9 Herstellung von Glasmessern

Glasmesser werden aus Glasstreifen (Plano) an einem Gerät zur Herstellung von Glasmessern (Leica) gebrochen. Anschließend wird ein „Trog“ zum Auffangen der Schnitte an jedes Messer angebracht.

2.2.3.10 Schneiden

Semidünnschnitte (1 μm) werden mit einem Glasmesser an einem Ultramikrotom hergestellt, aufgefangen und in einen Wassertropfen auf einem Objektträger überführt. Eingerollte Schnitte können mit CHCl_3 -Dampf entrollt werden. Der Objektträger wird auf eine Heizplatte aufgelegt, damit sich die Schnitte glattziehen und trocknen.

2.2.3.11 Färbung mit Toluidinblau

Die zuvor filtrierte Färbelösung wird ca. 1 h bei 65°C erwärmt. Anschließend werden die vorgewärmten Objektträger mit den Schnitten für 20-60 sec in die Toluidinblaufärbelösung gestellt. Anschließend werden die Objektträger mehrmals mit H_2O gewaschen und anschließend getrocknet. Bei Bedarf kann durch Waschen in verdünnter HCl-Lösung (pH 3) wieder entfärbt werden. Die Schnitte können dann mit Araldit eingedeckelt werden.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Die Zellen werden auf einer LB-Platte nach Angaben des Herstellers ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen in einer 5 ml ü.N. Vorkultur angeimpft und diese in einer 500 ml-Kultur bis zu einer OD 600 von 0,4 – 0,6 bei 37°C zum Wachsen gebracht. Die Zellen werden 10-15 min auf Eis gestellt und in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4000 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml kaltem dd H₂O resuspendiert. Erneutes Abzentrifugieren bei 4000 rpm für 15 min bei 4°C und Resuspendieren der Zellen in 20 ml kaltem 10% Glycerin-haltigem dd H₂O. Es folgt wiederholtes Abzentrifugieren wie schon zuvor beschrieben. Überstand verwerfen, Zellen in 2-3 ml 10% Glycerin/H₂O resuspendieren (sollte einer Zellkonzentration von 1-3x 10⁸ Zellen/ml entsprechen) und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern. Die Zellen sollten einer Zellkonzentration von 1-3x 10⁸ Zellen/ml entsprechen.

2.2.4.2 Elektrotransformation

Transformation von DNA in kompetente *Escherichia coli*-Stämme wurden mit dem *Gene Pulser* der Firma BIORAD nach gegebenen Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- 40 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA-Menge (1-2 µl) mischen
- in eine gekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführen
- Küvette in *Gene Pulser* (BIORAD) setzen
- Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm
(Einstellung am Gene Pulser: Kapazität –25 µF, Spannung –2,5 KV, Widerstand –200 Ω)
- Küvette schnell entnehmen und 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugeben

- mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorf-Gefäß überführen und bei 37°C für 30 min inkubieren
- auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausstreichen

2.2.4.3 DNA-Restriktion

Die DNA-Restriktionen mit den entsprechenden Enzymen erfolgen nach Angaben des Herstellers für die Restriktionsenzyme.

2.2.4.4 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel

- die Gelelektrophorese für die Elution erfolgt bei niedriger Spannung
- Ausschneiden der Banden mit einer Rasierklinge auf einem UV-Tisch
- Gelstücke mit 100 µl pro 0,1 mg bei 65°C inkubieren, bis sich die Gelmatrix aufgelöst hat
- kurz vortexen und auf die Säulen (Qiagen) geben
- 1 min bei 1300 rpm abzentrifugieren
- durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer auf die Säule und erneutem Abzentrifugieren DNA waschen
- Abzentrifugieren zum Trocknen der DNA
- Eluieren der DNA durch 30 µl Elutionspuffer

2.2.4.5 Gelelektrophorese

Trennung der DNA-Fragmente bei 100-150 V durch Horizontal-Gelelektrophorese im Agarosegel (0,8% zum Auftrennen großer Gelfragmente, bis zu 1,2% für kleine Fragmente) mit Ethidiumbromid (10 mg/ml H₂O, 3µl/100 ml). Als relatives Maß für die Größe der DNA-Fragmente dient eine 1 kb-Leiter (GIBCO/BRL).

2.2.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wird ein zweckmäßiges Volumen (3-5 µl) auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Standard dient 1 µg einer 1 kb-Leiter (GIBCO/BRL).

Die Konzentration der DNA-Lösung wird dann durch einen Vergleich der relativen Fluoreszenz-Intensitäten unter UV-Licht abgeschätzt. Eine Alternative dazu ist die Messung mit dem Photometer (Eppendorf). Dazu werden 2 µl der zu bestimmenden DNA in 198 µl H₂O verdünnt und gemessen.

2.2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wird der Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:4 eingesetzt. Wenn keine direktionale Klonierung erfolgt, sondern das DNA-Fragment nur durch Restriktion mit einem Enzym in den Vektor gebracht werden soll, muß der Vektor mit shrimps alkaliner Phosphatase (SAP, La Roche) dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Ligationsansatz:	100 ng	Vektor-DNA
	100-400 ng	DNA-Fragment
	2 µl	10x Ligationspuffer (Promega)
	1 µl	T4-Ligase (Promega)
	<hr/>	
add	20 µl	H ₂ O

Inkubation für 1 h bei 37°C oder ü.N. bei 16°C.

2.2.4.8 Sichtung einer genomischen Phagenbank

Zur Isolierung der genomischen Region um *schizo* wurde eine genomische Lambda-EMBL4-Phagenbank (Dr. Markus Noll, Zürich) gesichtet. Als Sonde dienten dabei die Fragmente, die

bei der inversen PCR (siehe Ergebnisse 3.3.1) der P-Elemente 1(3)L7062 und 1(3)L5541 gewonnen wurden. Diese wurden mit Fluorescein markiert wie unter 2.2.4.13.1 beschrieben.

2.2.4.8.1 Titrieren der Phagenbank

Zum Titrieren der Phagenbank wurde zunächst eine Verdünnungsreihe (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) des Phagenstamms in SM-Puffer hergestellt. Jeweils 10 μ l wurden zu 100 μ l frischer Q358-Zellen (in 10mM $MgSO_4/NZY$) in ein Reagenzglas gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden frische NZY-Agar-Platten getrocknet und NZY-Top-Agar geschmolzen und im 45°C-Wasserbad bereitgehalten. Dann wurden je 2 ml Top-Agar zu den Phagen/Zell-Gemischen gegeben und sofort ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C bis zur deutlichen Lyse inkubiert und aus der Zahl der Plaques der Phagentiter (in „plaque forming units“/ml = pfu/ml) bestimmt.

2.2.4.8.2 Ausplattieren der Phagen, Ziehen der Filter

Nach dem Titrieren der Phagenbank wurde die Bank zum Sichten ausplattiert. Es wurden jeweils etwa $4 \cdot 10^4$ pfu an 300 μ l Q358-Zellen adsorbiert und mit 7 ml Top-Agar auf 14 cm-Petrischalen ausplattiert. Insgesamt wurden etwa 240.000 Klone gesichtet. Die Platten wurden bis zur konfluenten Lyse bei 37°C inkubiert.

Zum Ziehen der Filter wurden runde *HybondN+*-Filter mit 13,7 cm Durchmesser verwendet (Amersham Buchler, Braunschweig). Die Filter wurden für etwa 60 sec auf die kalten Platten aufgelegt, vorsichtig mit zwei Pinzetten abgezogen und auf Whatman-Papier gelagert. Während die Filter auf der Platte auflagen, wurden sie mit einer tintenbefüllten Kanüle asymmetrisch durchstoßen, um eine eindeutige Zuordnung der Filter zu den Platten zu gewährleisten. Von jeder Platte wurde noch ein Duplikatfilter gezogen, der 4 min auflag. Diese Filter wurden entsprechend der bereits sichtbaren Tintenspuren markiert. Die Duplikatfilter erlauben den Ausschluß „falschpositiver“ Signale. Beide Filtersätze wurden für

1 min bei 105°C im Autoklaven „gebacken“, um die Phagen-DNA zu denaturieren und zu fixieren.

2.2.4.8.3 Hybridisierung mit nicht-radioaktiver Sonde

Nach dem Backen wurden die Filter mit einer fluorescein-markierten Sonde hybridisiert und detektiert.

2.2.4.8.4 Rescreen

Signalpositive Plaques wurden mit einer umgedrehten Pasteurpipette ausgestochen. Die Phagen wurden mit 1 ml SM ü.N. bei 4°C oder 30 min bei RT aus dem Agarpfropf eluiert. Jeweils 1 µl des Eluats sowie 1 und 10 µl einer 10⁻²-Verdünnung und 1 µl einer 10⁻⁴-Verdünnung wurden nach Adsorption an 100 µl Q358-Bakterien und 2 ml Top-Agar auf 82 mm-Petrischalen ausplattiert und ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden erneut Filter gezogen und hybridisiert. Das Rescreening wurde solange wiederholt, bis alle Plaques eines Eluats mit der Sonde hybridisierten, bis der Plaque also „plaque-pure“ aufgereinigt war. Dann erfolgte die Präparation der Phagen-DNA wie beschrieben.

2.2.4.8.5 Isolierung von Phagen-DNA

Vorkultur:

Ein ausgestochener Phagenplaque wurde in 1 ml SM-Puffer gelöst. Davon wurden 150 µl zu 300 µl einer *E.coli*-Bakteriensuspension gegeben und in 50 ml NZY-Flüssigmedium gegeben. Die Lösung wurde bei 37°C bis zur Lyse, erkennbar an der Flockenbildung in der Kultur, inkubiert. Anschließend werden 1 µl/ml Chloroform zugegeben und für 37°C erneut für 15 min inkubiert. Danach wird die Klutur dekantiert (ohne Chloroform) und 15 min bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 µl/ml Chloroform versetzt und kann bei 4°C über mehrere Monate gelagert werden.

Hauptkultur:

300 ml NZY-Flüssigmedium werden mit 5 ml einer *E.coli*-Bakterienlösung bis zur Eintrübung bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die Bakterienkultur mit 20 ml des Phagenüberstands aus der Vorkultur versetzt und für mehrere Stunden bis zur Lyse geschüttelt. Wenn die Lyse einsetzt (erkennbar an der Flockenbildung durch lysierte Bakterien) werden 325 µl Chloroform und 8 g NaCl zugegeben und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min bei 11.000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 5 µg/ml DNase/RNase versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert, um bakterielle DNA und RNA zu degradieren. Zur Präzipitation der Phagen wird die Lösung mit 110 ml 20%iger PEG-6000/3,5 M NH₄OAc Lösung versetzt und für 2 h auf Eis gestellt. Anschließend wird die Lösung für 10 min bei 10.000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Danach wurde das Pellet in 3 ml SM-Puffer resuspendiert.

Zur Aufreinigung und Isolierung der DNA wurde das resuspendierte Pellet mit 300 µl 0,5 M EDTA, 300 µl 20% SDS und 3 ml Phenol versetzt und für 10 min auf dem Taumler inkubiert. Der Ansatz wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abzentrifugiert (5 min bei 4.000g) und die obere wäßrige in ein neues Röhrchen gegeben. Die abgenommene Phase wurde mit einem Volumen Phenol versetzt und für 10 min auf dem Taumler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wird wieder die obere Phase abgenommen und zweimal mit Phenol/Chloroform 1:1 versetzt und anschließend zweimal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte jedes Mal durch Abzentrifugation für 1 min bei 4.000 g. Das verbleibende Chloroform wurde dann durch einmalige Extraktion mit 1/2 Vol. Diethylether abgetrennt. Die obere Etherphase wurde verworfen und der Ansatz für 1 min abzentrifugiert. Der restliche Ether verdunstete bei 65°C. Die Fällung der Phagen-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol. Nach Abzentrifugation wurde das Pellet mit 2 ml 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 300 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

- 2 ml LB-Medium (plus Antibiotika zur Selektion) werden mit einer Kolonie angeimpft
- ü.N. bei 37°C im Schüttler inkubieren
- ca. 1,5 ml Bakterienkultur in ein Eppendorf-Gefäß überführen, den Rest kühl lagern
- abzentrifugieren für 1 min bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge
- Überstand verwerfen und Pellet in 250 µl STET-Puffer resuspendieren
- Minis für 45 sec kochen und anschließend für 5 min bei 13 000 rpm abzentrifugieren
- den Überstand in 250 µl Isopropanol und 25 µl Ammoniumacetat fällen
- 15 min abzentrifugieren bei 13 000 rpm
- Überstand verwerfen und Pellets unter einer Lampe trocknen
- Pellets in 30 µl RNase-Wasser aufnehmen und 10 min bei 65°C lösen

2.2.4.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Präparationen von größeren Mengen DNA erfolgen aus einer 200 ml Übernachtskultur. Die Präparation erfolgt mit dem DNA-Präparations-Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH Düsseldorf) nach einem Protokoll des Herstellers.

2.2.4.11 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

- 40 Fliegen werden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und bei -20°C eingefroren
- die Fliegen werden in 300 µl Lysispuffer mit einem Homogenisator im Eppendorf-Gefäß homogenisiert
- Zugabe von 500 µl Lysispuffer und Inkubation für 30-45 min bei 65°C unter mehrmaligem Invertieren
- danach werden die Eppendorf-Gefäße auf Eis gestellt und 1/2 h mit 150 µl 8M KCl inkubiert
- abzentrifugieren bei 13 000 rpm für 30 min
- Überstand in ein neues Gefäß geben und erneut für 15 min abzentrifugieren

- Überstand in 700 µl Isopropanol und 75 µl 2M NaCl fällen und 30 min abzentrifugieren bei 13.000 rpm
- Pellet kurz trocknen (nicht zu lange!) und in 50 µl RNase-Wasser aufnehmen

2.2.4.12 Restriktion genomischer oder Phagen-DNA für Southern-Blot-Analysen

Es wurden für die Southern-Blot-Analysen 1-2 µg DNA mit 40 Einheiten Restriktionsenzym für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. 1/10 des Ansatz wurden dann gelelektrophoretisch auf die Vollständigkeit der Restriktion hin überprüft.

2.2.4.13 Southern-Blot-Hybridisierung (modifiziert nach Church, 1984)

Die Gelelektrophorese wurde bei niedriger Spannung (50-80V) durchgeführt, um eine möglichst gleichmäßige Auftrennung der Fragmente zu erreichen. Anschließend wurde das Gel mit einem Lineal daneben fotografiert und zur Depurinierung 20 min mit 0,25 M HCl behandelt. Danach erfolgte eine Neutralisierung mit 0,5 N NaOH, bevor der Blot für den ü.N. Kapillartransfer auf *HybondN+*-Membran (Amersham Buchler, Braunschweig) in 0,5 N NaOH aufgebaut wurde. Am nächsten Tag wurde die *HybondN+*-Membran 10 min in 2x SSC/ 0,1 M Tris, pH 7,5 neutralisiert. Die auf die Membran transferierten DNA-Fragmente wurden mit einem UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden mittels 120 mJ/cm² UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

2.2.4.13.1 Synthese fluorescein-markierter DNA-Sonden für Hybridisierungen

Zur Herstellung fluorescein-markierter DNA-Sonden wurde das *Gene Images random primer labelling module* (Amersham Buchler, Braunschweig) gemäß Anleitung verwendet. Dazu wurden ca. 150-200 ng DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.13.2 Hybridisierung mit der fluorescein-markierten DNA-Sonde

Der Blot wurde zunächst mindestens 30 min bei 65°C in 100 ml Church-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die DNA-Sonde wurde 5 min aufgekocht und zu der Church-Hybridisierungslösung gegeben in einer Konzentration von 10 ng/ml. Die Hybridisierung erfolgt ü.N.; anschließend kann die Hybridisierungslösung mit der Sonde bei -20°C gelagert und mehrmals wiederverwendet werden. Nach dem Abgießen der Hybridisierungslösung wird die Membran 2x 10 min bei 65°C mit Church-Waschlösung gewaschen.

2.2.4.13.3 Hybridisierungsnachweis

Nach dem Waschen der Membran wurde das Hybridisierungssignal mit dem *Gene Images CDP-Star detection module* (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) gemäß Anweisung des Herstellers nachgewiesen. Dazu wurde die Membran 1 h mit 100 ml 0,5% BSA/Puffer A geblockt. Danach erfolgte die Antikörperinkubation mit α -Fluorescein-AP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,5% BSA/Puffer A für 1 h. Der Antikörper wurde durch 3x 10 min Waschen mit 0,3% Tween-20/Puffer A entfernt. Nach dem Waschen wird die Waschlösung entfernt und der Blot auf eine Plastikfolie gelegt. Dort wird er mit dem *CDP-Star-Detection Reagent* für 5 min inkubiert (30-40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Mit einer Pipette wird die Detektionsflüssigkeit gleichmäßig auf dem Blot verteilt. Der so inkubierte Blot wird in die Plastikfolie eingeschlagen und mit einem Hyperfilm MP in einer Röntgenfilmkassette für eine variable Zeit exponiert. Die gebundene Sonde kann mit 90°C heißem 0,1%igem SDS abgewaschen werden, in dem der Blot 3x 15 min gewaschen wird. Der Blot kann anschließend wiederverwendet werden.

2.2.4.14 Inverse-PCR

Für die Inverse-PCR Reaktion muß die DNA zunächst mit den Restriktionsenzymen AluI, RsaI, MluI, DdeI und CfoI geschnitten und anschließend in einem großen Ligationsansatz ligiert werden.

2.2.4.14.1 Single Fly-PCR

Eine Alternative zur konventionellen DNA-Aufreinigung aus Fliegen stellt das Einzelfliegen-Protokoll dar (Gloor *et al.*, 1993):

- Betäubung der Fliegen in einem PCR-Reaktionsgefäß auf Eis
- Zugabe von 50 µl SquiB und 200 µg/ml Proteinase K
- Zerstoßen der Fliege mit einer Pipettenspitze
- Inkubation bei 37°C für 30 min
- anschließend Inaktivierung der Proteinase K bei 85°C für 2 min

Die DNA kann nun für eine PCR-Reaktion eingesetzt werden. Will man eine inverse PCR mit der so gewonnenen DNA aus einer Einzelfliege durchführen, so erfolgt nach der Inkubation bei 37°C die Zugabe von 1 µl PMSF und anschließende Inkubation für 15 min bei 65°C. Danach werden 8 µl der DNA für 20 min bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einem 20 µl-Ansatz restringiert und daraus 6 µl für eine Ligation eingesetzt. Die Ligation erfolgt 1 h bei 22°C in einem 10 µl-Ansatz. Diese 10 µl werden hinterher für die PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.4.14.2 Reaktionskomponenten für die PCR-Amplifikation

Für Standard-PCR-Amplifikationen (50 µl) wurde der folgende Reaktionsansatz eingesetzt. Für PCR-Ansätze mit 25 µl wurden die eingesetzten Volumina entsprechend halbiert.

Komponente	Finale Konzentration	Volumen
Template	gen. DNA: 100 ng Plasmid-DNA: 1-10 ng	x μ l
10 x Puffer	1x	5 μ l
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 μ l
dNTPs	200 μ M	1 μ l
Primer A (2 μ M)	400 nM	5 μ l
Primer B (2 μ M)	400 nM	5 μ l
Taq-DNA-Polymerase	1U	0,4 μ l
steriles H ₂ O		add 50 μ l

2.2.3.14.3 Temperaturprofile

Die Ausbeute und Spezifität der PCR wird beeinflusst von Konzentration, Zeit, Temperatur und Anzahl der Amplifikationsschritte. In den ersten beiden Schritten der PCR-Reaktion wird die Template-DNA denaturiert. Während des Annealings lagern sich die Primer an das Template an und in der darauffolgenden Extension wird das betreffende Fragment synthetisiert. Je nach T_m -Wert der verwendeten Primer und erwarteter Länge des PCR-Produkts werden unterschiedliche Annealing- und Extensionszeiten verwendet. In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Schritte dargestellt:

Schritt	Temperatur	Zeit/ Wiederholungen
Initialisierung	94°C	1:00 min
Denaturierung	94°C	0:40 min
Annealing	variiert je nach Primerpaar, 2-5°C unter dem T_m -Wert	1:00 min
Extension	72°C	1:00 -2:00 min
Wiederholungen ab der Denaturierung		29-34x
Finale Extension	75°C	10:00 min
Kühlen	4°C	nach Bedarf

2.2.4.15 Aufreinigung von PCR-Produkten

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

2.2.4.16 Klonierung von PCR-Produkten

Die konventionelle Klonierung von PCR-Produkten gestaltet sich schwierig, da sie Taq-Polymerase 3'-Nucleotidtransferase-Aktivität aufweist. Es entstehen daher bei der PCR-Amplifikation 3'-Adenin-Überhänge. Aus diesem Grund werden spezielle Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten angeboten, die mit 5'-Thymin-Überhängen versehen sind. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich das *pGEM-T-Easy-PCR-cloning kit* der Firma Promega (Mannheim) verwendet, das entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet wurde.

2.2.4.17 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem Amersham Sequenzierungs-Kit (*Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Ausgewertet wurden die Sequenzreaktionen mit dem ABIPRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt). Analysiert wurden die Sequenzdaten mit den Programmen des *Lasergene DNASTAR Software Package* (GATC, Konstanz).

3. Ergebnisse

3.1 Phänotypische Untersuchungen

Das Gen *schizo*, das in dieser Arbeit genetisch und molekular charakterisiert wurde, ist in einer EMS-Mutagenese von Thomas Hummel erstmals identifiziert worden und spielt eine wesentliche Rolle bei der Bildung der Kommissuren. Es wurden zwei Allele des *schizo*-Lokus isoliert, *schizo*^{U112} und *schizo*^{C1-028} (Hummel, 1998), die in Transheterozygose letal sind. In beiden *schizo*-Allelen ist die Ausbildung der Kommissuren reduziert. Die phänotypische Analyse zeigte, daß *schizo*^{U112} das stärkere Allel ist (Hummel *et al.*, 1999).

3.1.1 Marker für die Untersuchung des axonalen Muster

Zur Charakterisierung des neuronalen Phänotyps wurden die monoklonalen Antikörper (mAb) BP102, 1D4 (anti-FasII) und 22C10 verwendet, die unterschiedliche neuronale Strukturen erkennen. Der mAb BP102 erkennt die Haupt-Axonbahnen des ventralen embryonalen Nervensystems, die in einem strickleiterförmigen Muster organisiert sind (siehe Einleitung). Mit Hilfe dieses Antikörpers können Defekte im axonalen Muster sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 4). Der monoklonale Antikörper 1D4 (anti-FasII) markiert drei voneinander getrennte longitudinale Axontrakte auf jeder Seite der Mittellinie. Auf diese Weise können Projektionsfehler in diesen Axontrakten sichtbar gemacht werden. Die Identifizierung neuronaler Veränderung auf der Ebene einzelner Neurone und ihrer axonalen Projektion sowie die Erkennung von Defekten des peripheren Nervensystems (PNS) ist mit dem mAb 22C10 möglich. Dieser Antikörper erkennt das Microtubuli-assoziierte Protein Futsch (Hummel *et al.*, 2000; Roos *et al.*, 2000) und markiert im frühen embryonalen ZNS selektiv spezifische Neurone (aCC-, MP1-, MP2-, RP1- und VUM-Neurone). In der späteren Entwicklung erkennt der mAb 22C10 alle PNS-Neurone.

Um die Projektion einzelner Axone in *schizo*-Mutanten genauer zu untersuchen, wurden zwei Markerlinien verwendet: *Sema2b- τ myc* und *ems-lacZ* (Rajagopalan *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2000). Die Expression dieser Marker in den zu analysierenden Axonen kann mit den Antikörpern mAb 9E10 (anti-Myc) und anti- β -Galaktosidase sichtbar gemacht werden.

3.1.2 ZNS-Defekte in *schizo*-Mutanten

Das embryonale ZNS in *schizo*-Mutanten wurde zunächst mit dem mAb BP102 analysiert. Im Wildtyp erkennt man auf jeder Seite des Embryos die longitudinalen Konnektive, die durch je eine anteriore und posteriore Kommissur in jedem Neuromer miteinander verbunden werden (Abb. 4A, Pfeile). In Embryonen, die homozygot mutant für das *schizo*^{U112}-Allel sind, kreuzen weniger Axone die Mittellinie (Abb. 4B). Der Phänotyp des *schizo*^{C1-028}-Allels ist schwächer ausgeprägt, die Neuomere der meisten Segmente zeigen ein noch vollständig vorhandenes Kommissurenpaar. In *schizo*^{C1-028}-mutanten Embryonen fehlt vorwiegend die anteriore Kommissur in den thorakalen und den vorderen abdominalen Segmenten (A1-A3) (Abb. 4C).

Die Beobachtung, daß in *schizo*-Mutanten hauptsächlich die anteriore Kommissur betroffen ist, führte zu einer detaillierten Untersuchung der anterioren Kommissur mittels spezifischer Marker. Mit dem *Sema2b- τ myc* Marker (Rajagopalan *et al.*, 2000) kann man das Wachstumsverhalten einzelner Neurone beobachten. *Sema2b- τ myc* markiert sowohl den Zellkörper als auch die Axone von zwei bis drei Neuronen in den Hemineuromeren der fünf posterior gelegenen abdominalen Segmente, A4-A8. Wie in Abb. 4D zu sehen, projizieren diese lateral positionierten Neurone ihr Axon durch die anteriore Kommissur auf die contralaterale Seite. Anschließend wachsen sie in einem diskreten Faszikel im longitudinalen Konnektiv weiter. Eine Analyse der homozygot mutanten *schizo*^{C1-028} *Sema2b- τ myc* Embryonen mit dem mAb 9E10 zeigte eine fehlerhafte Projektion der *Sema2b- τ myc* exprimierenden Axone (Abb. 4E) und eine Defaszikulierung der longitudinalen Axone (Abb. 4F). Ein Fehlen der *Sema2b- τ myc* exprimierenden kommissuralen Axone in den abdominalen Segmenten A4-A8 ist allerdings nicht zu beobachten. Dies kann daran liegen, daß in dem *schizo*^{C1-028}-Allel hauptsächlich die weiter anterior gelegenen Kommissuren betroffen sind, die mit dem *Sema2b- τ myc* Marker nicht sichtbar gemacht werden können.

Es wurde daher eine andere Markerlinie verwendet, die die anteriore Kommissur in allen Segmenten markiert. Die *empty spiracles (ems)-lacZ*-Reporterlinie enthält die 8,2 kb regulatorische Region des *ems*-Gens in Fusion mit einem *lacZ*-Reportergen (*ems-LacZ* 8.2),

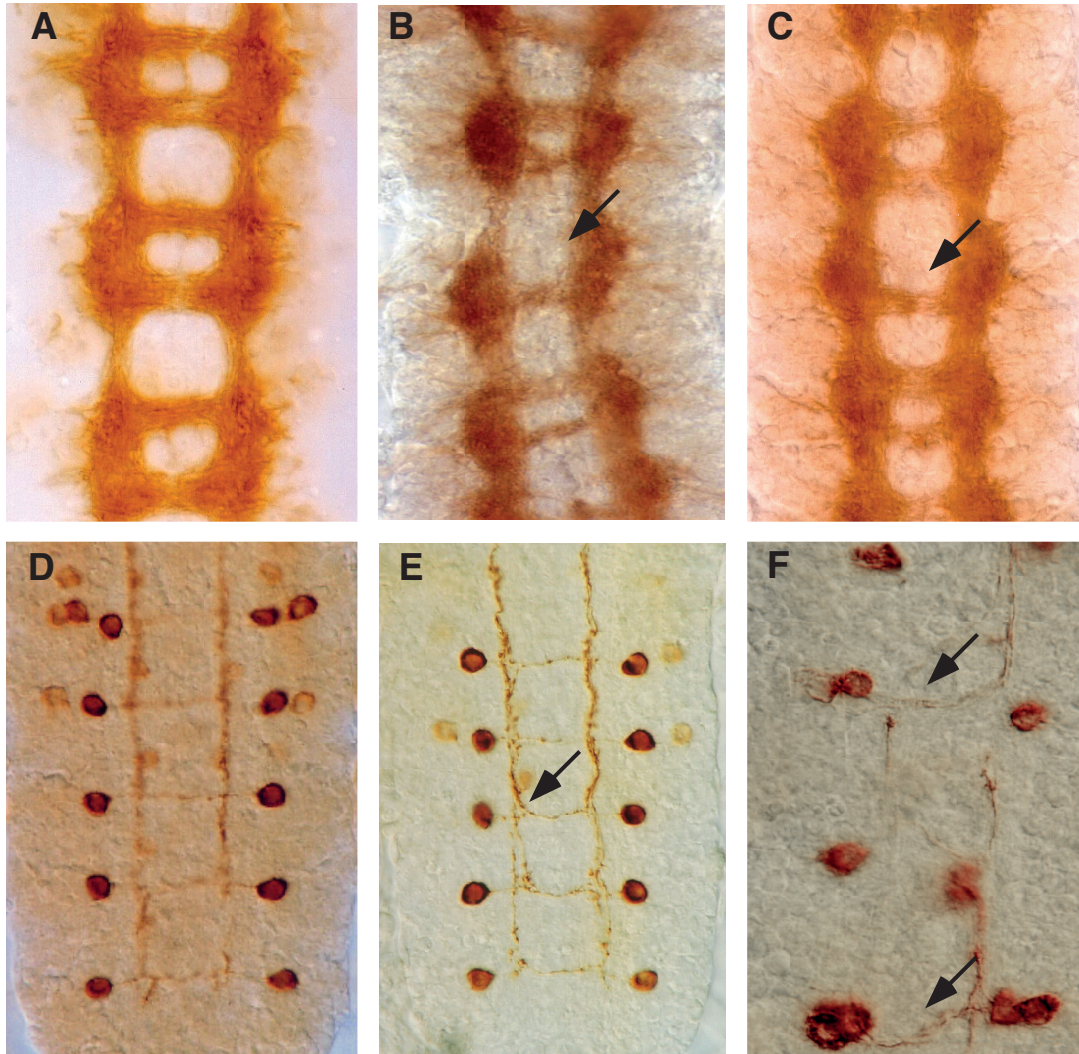


Abb. 4 Phänotypische Analyse der *schizo*-Mutationen. Frontalansicht auf ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen. (A) wildtypische ZNS-Färbung mit dem mAb BP102, (B) zeigt die Mutante *schizo*^{U112} und (C) die Mutante *schizo*^{C1-028}. In (B) und (C) sind die Kommissuren reduziert und es fehlt *schizo*^{C1-028} vorwiegend die anteriore Kommissur (Pfeil). Die anteriore Kommissur des *schizo*^{C1-028}-Allel wurde mit dem Marker Sema2b- τ myc untersucht. (D) stellt den Wildtyp dar. Man erkennt 1-3 Neurone pro Hemineuromer, deren Axone contralateral in die anteriore Kommissur projizieren. In (E) und (F) Sema2b- τ myc Expression in *schizo*^{C1-028}-Embryonen Die longitudinalen Axone in (E, Pfeil) erscheinen defaszikuliert und es kommt zu Fehlprojektionen (F, Pfeile).

(Hartmann *et al.*, 2000). Die Expression des Reportergens beginnt schon in der frühen embryonalen Entwicklung ab Stadium 6/7 im Ektoderm. Zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung wird das *ems*-Reporter gen in jedem Neuromer des ventralen Nervensystems in den Interneuronen exprimiert, die aus den Neuroblasten (NB) 3-5 und 4-4 (Schmidt *et al.*, 1997) hervorgehen. Die Proteinexpression des Reporter gens kann cytoplasmatisch mit dem anti- β -Galaktosidase Antikörper nachgewiesen werden. Auf diese Weise erkennt man die axonale Projektion der *ems*-exprimierenden Interneurone. Die zu Beginn der Axogenese markierten Interneurone bilden eine Zellgruppe im lateralen Bauchmark und senden ihre Axone in die anteriore Kommissur (Abb. 5B). In homozygot mutanten *schizo*^{U112}-Embryonen, die die *ems-lacZ*-Markerlinie in Heterozygose tragen, sind einige der *ems*-exprimierenden NB zur Mittellinie hin verschoben. In der Regel scheinen weniger kommissurale Axone den *ems-lacZ* Marker zu exprimieren. (Abb. 5E. und F.).

Die Untersuchungen der Rekombinanten mit dem *Sema2b-tmyc* Marker zeigten ebenfalls Defekte in der Ausprägung der longitudinalen Axontrakte. Eine genaue Analyse der Konnektive des embryonalen ZNS in *schizo*-Mutanten wurde daher mit Hilfe des mAb 1D4 (anti-FasII) unternommen. Im Wildtyp (Abb. 6A) erkennt man im Stadium 16 drei voneinander getrennte longitudinale Faszikel rechts und links der Mittellinie. In *schizo*-Mutanten erscheint das lateral gelegene Faszikelbündel reduziert (Abb. 6B, C). Weiterhin beobachtet man eine Defaszikulierung der longitudinalen Trakte.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß homozygot mutante *schizo*-Embryonen Defekte in der axonalen Wegfindung zeigen, die sich in dem schwächeren *schizo*-Allel vorwiegend in dem Verlust der anterioren Kommissur äußert. Zusätzlich weisen *schizo*-mutante Embryonen eine Defaszikulation in den longitudinalen Konnektiven auf. Der kommissurale Phänotyp der *schizo*-Mutanten zeigt, daß *schizo* eine wichtige Rolle bei der Bildung der Kommissuren spielt.

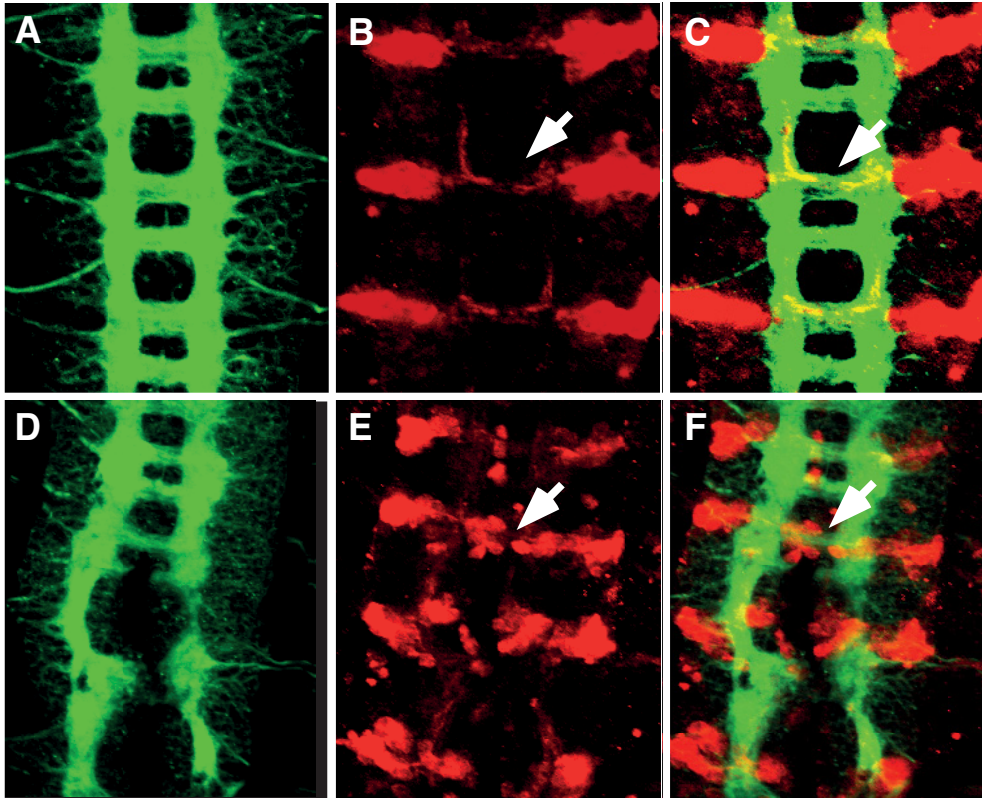


Abb. 5 Analyse der anterioren Kommissur mit der Marker-Linie *ems-lacZ*. (A)-(C) Frontale Ansicht des Bauchmarks von *ems-lacZ* Embryonen. (A) Das Strickleiternnervensystem wurde mit dem Ab HRP gefärbt und die Expression von *ems-lacZ* wurde mit dem β -Galaktosidase Antikörper sichtbar gemacht (B). In (C) sind beide Färbungen übereinandergelegt. (D)-(F) zeigt die Expression von *ems-lacZ* in *schizo*^{U112}-Embryonen. (D) Der kommissurale *schizo*-ZNS-Phänotyp. (E) Die *ems-lacZ* exprimierenden NB in *schizo*^{U112} sind fehlerhaft positioniert und es kreuzen weniger Axone die Mittellinie (Pfeil). In den Segmenten, in denen die Kommissuren korrekt gebildet werden, sind auch die Axone der anterioren Kommissur zu erkennen (F, Pfeil). In einigen Segmenten wird β -Galaktosidase auch in den Mittellinienzellen exprimiert (E) und (F), dies wurde allerdings auch für die wildtypische Expression von *ems-lacZ* beschrieben (Hartmann *et al.*, 2000).

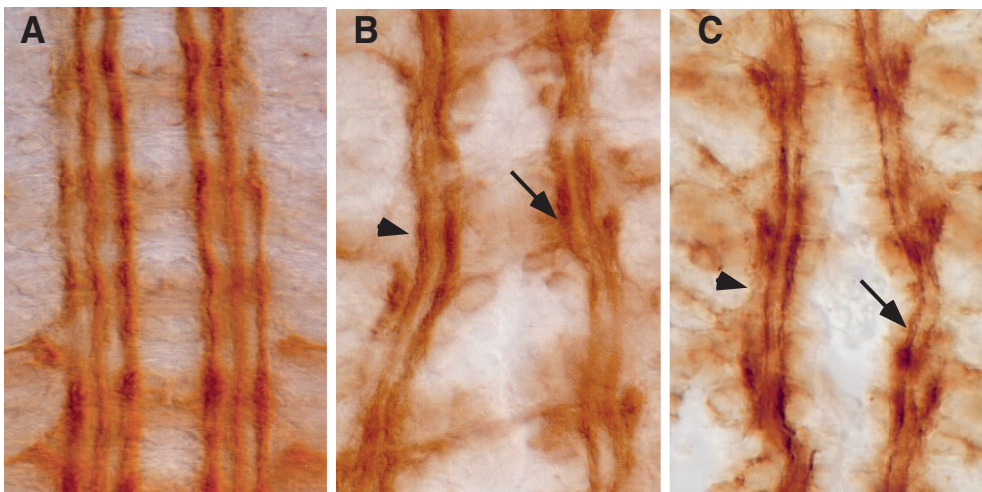


Abb. 6 Untersuchung der longitudinalen Faszikel. Immuohistologische Färbung mit dem mAb 1D4. Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. (A) zeigt den Wildtyp. Man erkennt drei longitudinale Faszikel rechts und links der Mittellinie. In (B) und (C) sind die *schizo*^{U112}- und *schizo*^{C1-028}-Mutanten zu sehen. Die Faszikel erscheinen in beiden Mutanten defaszikuliert (Pfeile) und das äußere Faszikel ist defekt (Pfeilspitze).

3.1.3 Untersuchungen einer möglichen Interaktion zwischen dem Gen *schizo* und den Genen der axonalen Wegfindung *netrin* und *slit*

Der in *schizo*-Mutanten beobachtete ZNS-Phänotyp erinnert an den kommissuralen Phänotyp von *netrin*-mutanten Tieren (Harris *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1996). Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit könnte, *schizo* eine Komponente des an der Mittellinie wirkenden attraktiven Netrin-Signalwegs kodieren. Die Reduktion der Kommissuren wäre demnach auf einen Verlust der *netrin*-Funktion zurückzuführen. Der *schizo*-ZNS-Phänotyp könnte ebenso durch eine erhöhte Expression des repulsiven Slit-Signals hervorgerufen werden: die erhöhte Slit-Expression verhindert die Antwort der Axone auf das attraktive Signal. Es ist aber auch möglich, daß *schizo* unabhängig von Slit und Netrin wirkt. In dem folgenden Abschnitt soll der Frage nachgegangen werden, ob die *schizo*-Funktion in eine der beiden oben geschilderten Signalkaskaden eingeordnet werden kann, oder ob *schizo* eine neue Komponente einer Attraktion vermittelnden Signalkaskade kodiert.

3.1.3.1 Doppelmutantenanalyse

Die zwei in *Drosophila* bekannten *netrin*-Gene, *netrin-A* und *netrin-B*, sowie der Netrin-Rezeptor *frazzled* bilden das attraktive System für kommissurale Axone und sind evolutionär konserviert. Nur der Verlust beider *netrin*-Gene führt zu einem fast vollständigen Verlust der kommissuralen Axone. Da in *netrin*-Mutanten immer noch Kommissuren gebildet werden, ist ein neben dem Netrin-Signalweg paralleler, Netrin-unabhängiger Signalweg denkbar. Der Verlust der *frazzled*-Genfunktion prägt sich in einem noch schwächeren kommissuralen Phänotyp aus. Um eine mögliche Funktion des Gens *schizo* in einem attraktiven Signalweg nachzuweisen, wurde von T. Hummel und K. Schimmelpfeng eine Doppelmutantenanalyse durchgeführt. Sollte *schizo* eine Komponente des Netrin-Signalwegs sein, so würde man keine wesentliche Verstärkung des kommissuralen *frazzled*-Phänotyps erwarten. Für die Doppelmutantenanalyse wurde das *frazzled*^{C1-62}-Allel und die *Df(2)vg*, die den *frazzled*-Lokus deletiert, verwendet.

Die doppelt mutanten Embryonen zeigen einen stark synergistischen Effekt bei der Bildung der Kommissuren. Es kommt zu einem kompletten Verlust der Kommissuren was entweder auf ein fehlendes attraktives System zurückzuführen ist oder auf eine Verstärkung des repulsiven Signals. Falls *schizo* im attraktiven System agiert, legt die genetische Analyse nahe, daß *schizo* unabhängig vom Netrin-Signalweg wirkt.

Da das von Hummel *et al.* (1999b) verwendete *fra*^{C1-62}-Allel und die Defizienz *Df(2)vg* außer *fra* noch weitere Gene betreffen, wurde die Doppelmutantenanalyse mit einem unabhängigen amorphen *frazzled*-Allel (*fra*^{23H9}) und der *netrin*-Defizienz wiederholt. Die *schizo/frazzled*^{23H9}- und *schizo/Df(netrin)*-Doppelmutanten zeigen den schon zuvor beobachteten synergistischen Effekt (Abb. 7C und D). Dieses Experiment legt nahe, daß der embryonale ZNS-Defekt in den doppelt mutanten *schizo/frazzled*-Embryonen tatsächlich durch die Mutation in *fra* hervorgerufen wird und nicht durch weitere von der Defizienz aufgedeckte Loci.

3.1.3.2 Expression von *netrin* in *schizo*-Mutanten

Eine mögliche Regulation von *netrin* durch *schizo* auf transkriptioneller Ebene ließe sich durch einen Verlust der *netrin*-RNA-Expression in *schizo*-mutanten Embryonen zeigen. Dieser Nachweis erfolgte mit Hilfe der *netrin-A*-RNA-Sonde durch *whole mount-in situ*-Hybridisierung an *schizo*-defizienten Embryonen. Dazu wurde die Defizienz *Df(3L)ME178* (siehe Abb. 18) benutzt, die den *schizo*-Phänotyp zeigt. Um die homozygot mutanten Embryonen von den heterozygoten Embryonen zu unterscheiden, erfolgte im Anschluß an die RNA *in situ*-Hybridisierung eine immunhistologische Färbung mit dem mAb BP102. In wildtypischen Embryonen erkennt man die Expression der *netrin-A*-RNA in den Mittelliniengliazellen zwischen der anterioren und der posterioren Kommissur (Abb. 8A). Ein Verlust des *netrin-A*-Transkripts in *schizo*-defizienten Embryonen ließ sich nicht nachweisen (Abb. 8B und C). Die *netrin*-RNA-Expressionsstudien bestätigen somit das Ergebnis der Doppelmutantenanalyse. Eine mögliche Regulation von Netrin auf Proteinebene ließ sich nicht untersuchen, da keine Antikörper gegen das Netrin-Protein zur Verfügung standen. Die

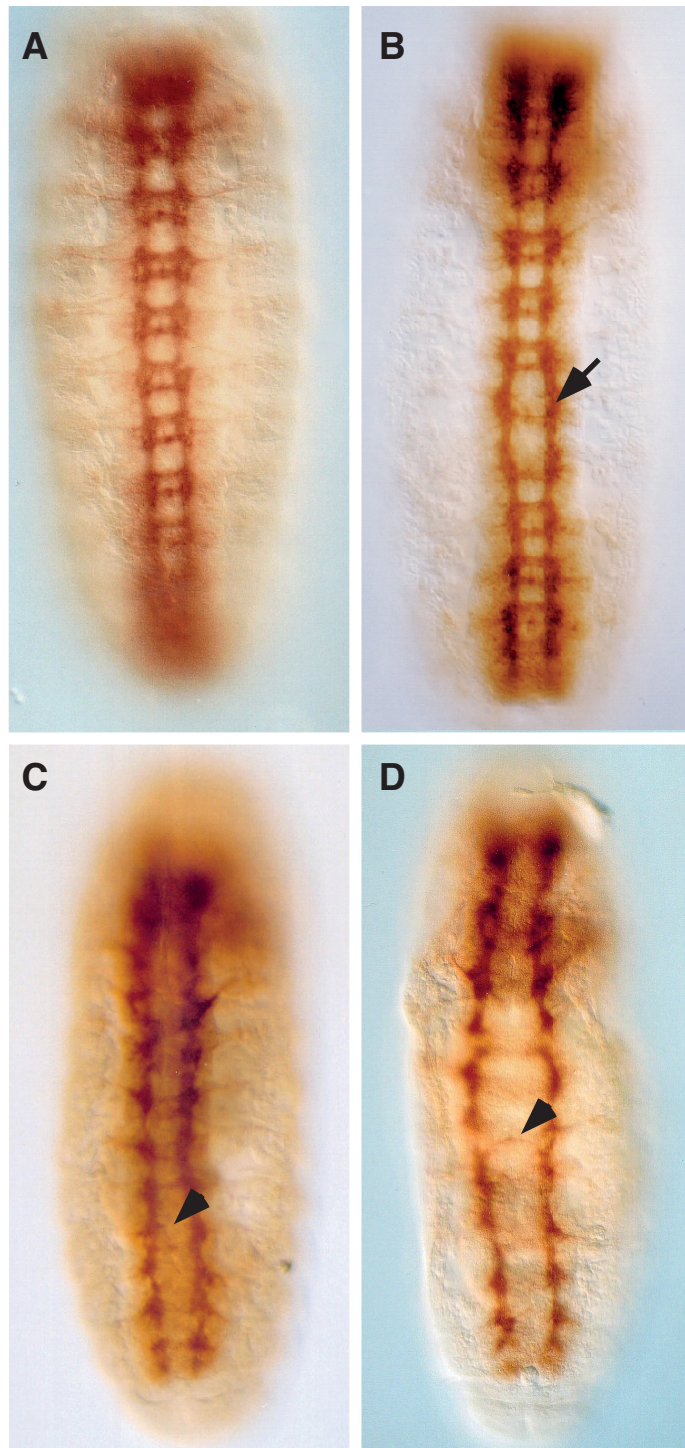


Abb 7 Doppelmutantenanalyse. *whole mount*-Antikörperfärbung an Embryonen des Stadium 15 mit dem mAb BP102 und anschließender HRP-Immunohistochemie, anterior ist oben. (A) Wildtyp; (B) *schizo*^{U112}; (C) *netrin/schizo* und (D) *frazzled*^{23H9/schizo}. (B) Mutante *schizo*^{U112} Embryonen zeigen einen reduzierten Kommissuren Phänotyp (Pfeil). (C) Die *netrin/schizo*^{U112} - und (D) die *frazzled/schizo*^{U112}-Doppelmutanten zeigen eine drastische Reduktion der Kommissuren (Pfeilspitzen).

bisher erhaltenen Ergebnisse allerdings weisen darauf hin, daß das Gen *schizo* nicht am *netrin*-Signalweg beteiligt ist.

In *schizo*-defizienten Embryonen beobachtet man mit der *netrin-A*-RNA-Sonde Defekte in den Mittelliniengliazellen. Die Zellen der Mittellinie erscheinen in den *schizo*-defizienten Embryonen teilweise falsch positioniert. Eine genauere Analyse der Mittellinienzellen erfolgte auf Grund dieser Beobachtung unter 3.1.4.

3.1.3.3 Überexpression von Netrin in der Mittellinie im *schizo*-mutanten Hintergrund

Die Analyse der *frazzled/schizo*- und *netrin/schizo*-Doppelmutanten, in denen die Axone von der Mittellinie weg in die Peripherie wachsen, läßt vermuten, daß *schizo* unabhängig von Netrin wirkt. In dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob eine Überexpression von Netrin in homozygot mutanten *schizo*^{C1-028}-Embryonen einen Effekt auf die Bildung der Kommissuren hat. Zu diesem Zweck wurde NetrinB in den Zellen der Mittellinie mit den Treiberlinien *sim*- und *slit-GAL4* überexprimiert. Abb. 9B und C zeigt die Überexpression mit *slit-GAL4*. In allen homozygot mutanten *schizo*^{C1-028}-Embryonen wird die anteriore Kommissur wieder gebildet. In einigen Segmenten sieht es so aus, als ob mehr Axone die Mittellinie kreuzen (Abb. 9B, Pfeil). Es treten häufig Projektionsdefekte in den longitudinal projizierenden Axonen auf (Abb. 9B und C, Pfeilspitze). Die Tatsache, daß eine erhöhte *netrin*-Expression den kommissuralen Phänotyp von *schizo*-Mutanten retten kann, legt eine Interaktion der beiden Signalwege nahe.

3.1.3.4 Expression von SLIT in *schizo*-Mutanten

Im folgenden wurde eine mögliche regulatorische Funktion von *schizo* auf *slit* untersucht. Es sollte dazu mit Hilfe des mAb C555.6D (anti-Slit) die Expression von Slit in homozygot mutanten *schizo*-Embryonen analysiert werden. Die Embryonen wurden zusätzlich mit einem gegen ein Referenz-Epitop gerichteten Antikörper inkubiert und konfokal ausgewertet. Als Referenz-Epitop wurde das HRP-Antigen verwendet, eine Zucker-Modifikation, die auf einer

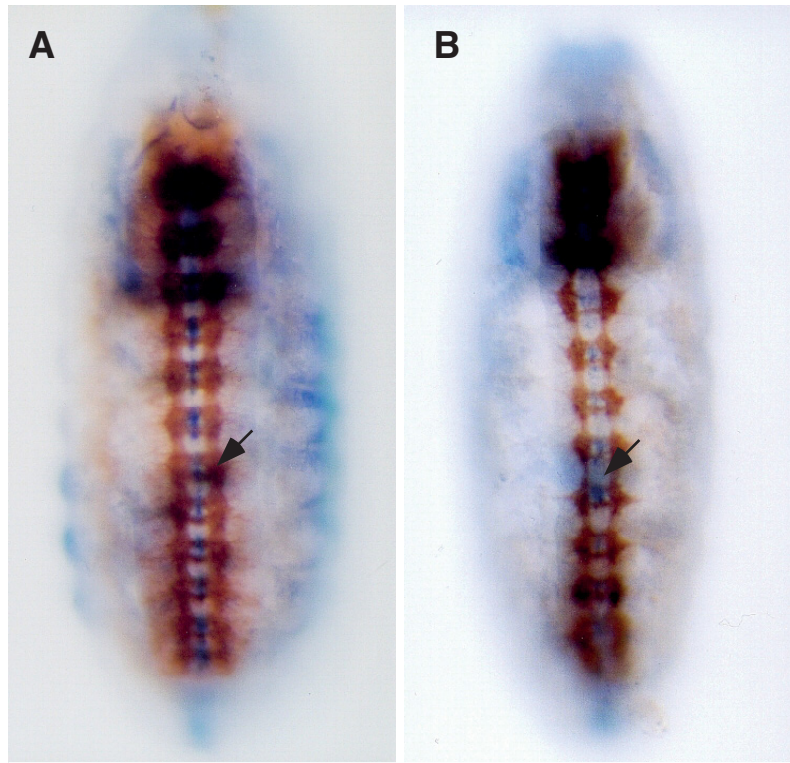


Abb. 8 Expression von *netrin-A* in *schizo*-defizienten Embryonen. *whole-mount* RNA *in situ*-Hybridisierung mit anschließender mAb BP102 immunhistologischer Färbung an Embryonen des Stadium 15, anterior ist oben. (A) Wildtyp. *netrin-A* ist in den Mittel-liniengliazellen exprimiert, die zwischen der anterioren und der posterioren Kommissur liegen (Pfeil). (B) In der *Df(3L)ME178*, die den *schizo*-Phänotyp zeigt, ist das *netrin-A* Transkript in den Zellen der Mittellinie exprimiert (Pfeil).

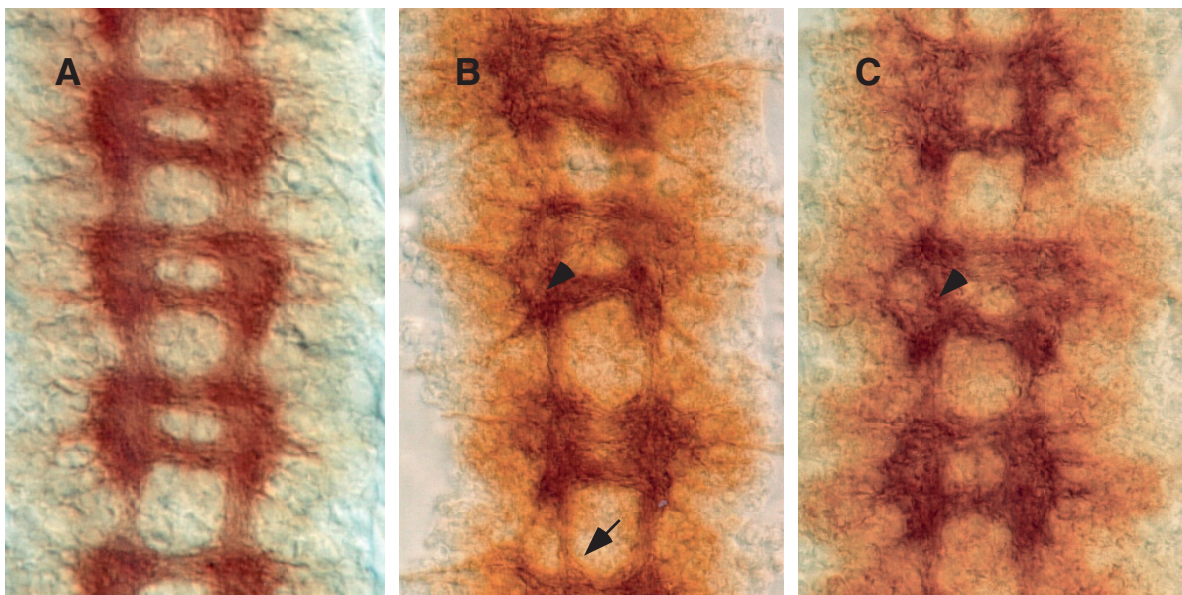


Abb. 9 Überexpression von UAS *netrin B* in homozygot mutanten-*schizo* Embryonen. Detailaufnahme von ZNS-Präparationen des Stadium 16 nach Antikörperfärbung mit dem mAb BP102 und HRP-Immunhistochemie. (A) Wildtyp. (B) und (C) Überexpression von UAS *netrin B* mit der Treiberlinie *sli-GAL4* im *schizo*-mutanten Hintergrund. Der *schizo*-Phänotyp ist in den UAS *netrin B/sli-GAL4*-Tieren nicht mehr zu beobachten. Im Vergleich zum Wildtyp beobachtet man eine Reduktion der Konnektive (B, Pfeil) und eine Fehlprojektion der longitudinalen Axone (B und C, Pfeilspitzen).

großen Anzahl von unabhängigen Neuronen präsent ist, und dessen Expression folglich nicht in *schizo*-mutanten Embryonen betroffen sein sollte. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch einen Vergleich der Intensität der Slit- und HRP-Signale (Abb. 10). Das Slit-Protein wird von den Mittelliniengliazellen sezerniert und bleibt an der Membran lokalisiert (Abb. 10E). In homozygot mutanten *schizo*-Embryonen scheint Slit stärker exprimiert zu sein als im Wildtyp. Zusätzlich erscheint die Verteilung des Slit-Proteins im Vergleich zum Wildtyp verändert zu sein (Abb. 10F). Wie schon zuvor in den RNA-*in situ*-Hybridisierungen mit *netrin* beobachtet, werden auch mit dem anti-Slit Antikörper Positionsdefekte der Mittelliniengliazellen deutlich.

3.1.3.5 Nachweis der genetischen Interaktion von *slit* und *schizo*

Wenn die in *schizo*-Mutanten beobachtete Reduktion der Kommissuren auf die Kontrolle des Expressionslevels von *slit* zurückzuführen ist, dann sollten die beiden *schizo*-Allele auch genetisch mit der hypomorphen Mutation in *slit* interagieren. In Abb. 11B ist der Phänotyp von homozygot mutanten *slit*⁵⁵⁰-Embryonen dargestellt. Das hypomorphe Allel *slit*⁵⁵⁰ führt zu einem relativ milden mutanten Phänotyp (Battye *et al.*, 2001). Das Bauchmark erscheint schmal und die anteriore und posteriore Kommissur eines Neuromers werden nicht in distinkte Faserbündel getrennt und erscheinen fusioniert. Zudem sind die Konnektive in *slit*⁵⁵⁰-mutanten Embryonen reduziert. Abb. 11C zeigt einen *slit*^{550/+}; *schizo*^{C1-028/-}-mutanten Embryo. Homozygot mutante *schizo*-Embryonen zeigen einen Mitteldarmdefekt, über den sich die *schizo*-Mutanten eindeutig identifizieren lassen. Bereits die geringe Reduktion der Slit-Dosis führt zu einer partiellen Rettung des mutanten *schizo*-Phänotyps. Die anteriore Kommissur wird wieder gebildet, nur die Konnektive sind weiterhin reduziert. Das Bauchmark von doppelmutanten *slit*⁵⁵⁰/*schizo*^{C1-028}-Embryonen hingegen sieht fast wildtypisch aus (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.6 Nachweis der genetischen Interaktion von *robo* und *schizo*

Die erhöhte Expression von Slit in *schizo*-mutanten Tieren schließt nicht aus, daß *schizo* auch einen Einfluß auf die Expression des Slit-Rezeptors Robo hat.

Die oben geschilderten Befunde zeigen, daß *schizo* mit *slit* interagiert und diese Wechselwirkung möglicherweise auf eine erhöhte Expression von Slit in der Mittellinie zurückzuführen ist. Falls diese Hypothese stimmen sollte, müßte der durch Verlust der *schizo*-Funktion bedingte kommissurale Phänotyp auch durch eine Reduktion der Dosis des Slit-Rezeptors Roundabout abgeschwächt werden können.

In Abb. 12B ist der *robo*⁰¹⁻¹⁰³-Phänotyp dargestellt. Die anteriore und posteriore Kommissur sind fusioniert und die Konnektive erscheinen stark reduziert. Sowohl für *schizo*^{U112} als auch für *schizo*^{C1-028} konnte eine Rettung des kommissuralen Phänotyps *schizo*-mutanter Embryonen durch die Herausnahme einer Kopie *robo* gezeigt werden (Abb. 12C und D). Auch hier konnten die homozygot mutanten *schizo*-Embryonen eindeutig über den defekten Mitteldarm identifiziert werden.

3.1.3.7 Genetische Interaktion von *schizo* und *Calmodulin*

Eine weitere Komponente, die am repulsiven Signalweg beteiligt ist und vermutlich unterhalb von Robo wirkt (Fritz *et al.*, 2000), ist Calmodulin (CaM). Calcium reguliert das Wachstumsverhalten des Wachstumskegels (Goldberg & Grabham, 1999; Gomez & Spitzer, 1999) und ist an der Regulation einer Vielzahl Ca²⁺-abhängiger intrazellulärer Prozesse beteiligt. Die selektive Unterbindung der CaM-Funktion durch einen CaM-Antagonisten oder durch *cam*-Mutationen in *Drosophila* führt zu axonalen Wegfindungsdefekten (VanBerkum & Goodman, 1995). Für *slit* und *robo* konnte eine Interaktion mit CaM nachgewiesen werden (Fritz *et al.*, 2000). Es wird vermutet, daß CaM durch die Bindung von Slit an den Robo-Rezeptor aktiviert wird.

Im folgenden wurde eine mögliche genetische Interaktion von *schizo* und *cam* untersucht. In Abb. 13B ist das *cam*-Allel *l(2)k04213* dargestellt. In homozygot mutanten *cam*-Embryonen erscheint das Bauchmark schmaler und die Kommissuren sind verdickt (Abb. 13B). Doppelt

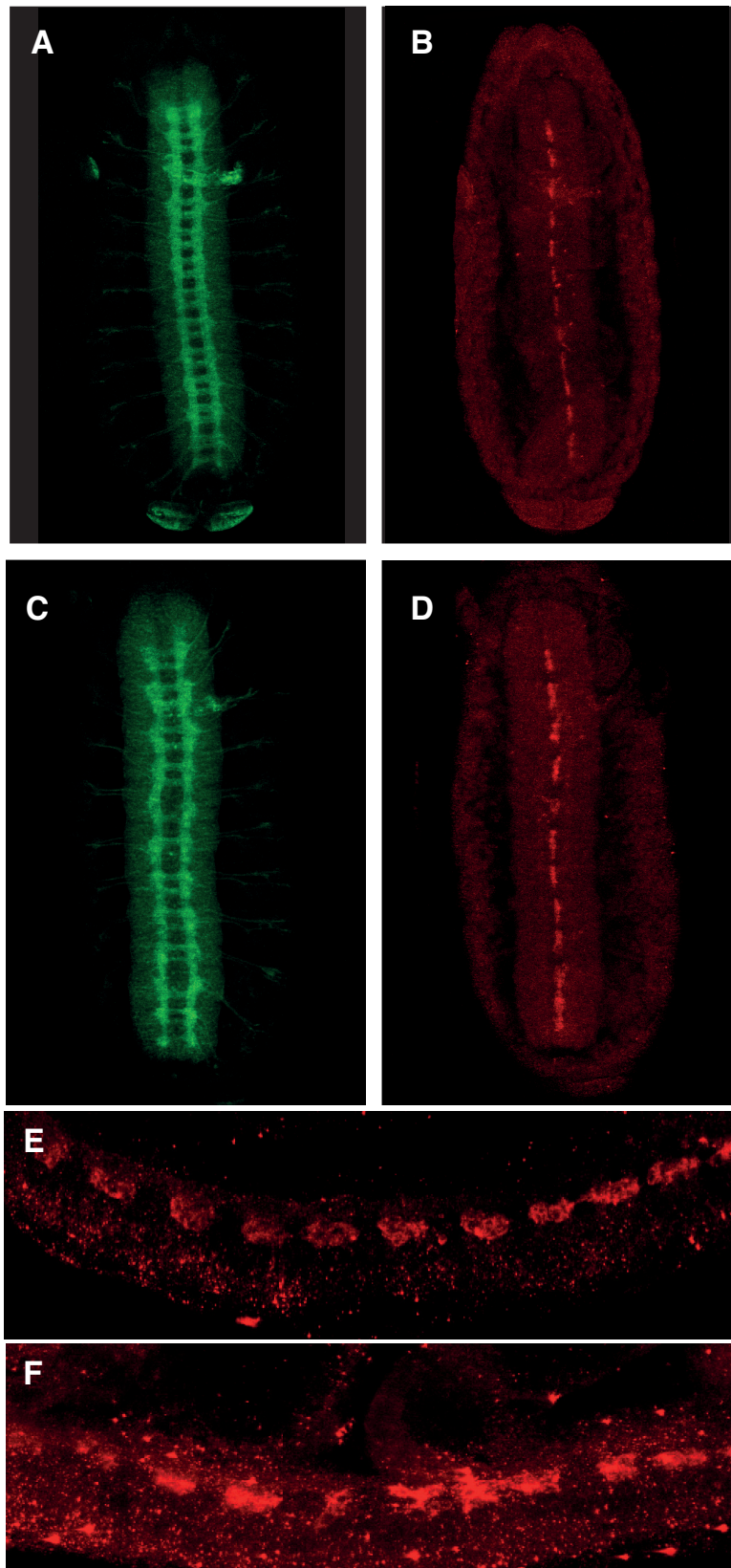


Abb. 10 Expression von Slit in *schizo*-mutanten Embryonen. Konfokale Antikörperfärbung an *whole mount*-Embryonen des Stadium 16 mit dem anti-HRP und anti-Slit Antikörper. (A), (B) und (E) zeigen den Wildtyp, wobei (B) und (E) mit dem anti-Slit gefärbt wurden. (E) Detailaufnahme in lateraler Ansicht. (C) und (D) zeigen die Mutante *schizo*^{C1-028}. Im Vergleich zum Wildtyp erscheint die Slit-Expression in der *schizo*-Mutante verstärkt. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch einen Vergleich der Intensität zwischen anti-Slit und anti-HRP. In der Detailaufnahme in (E) erscheint die Slit-Verteilung membranständig zu sein. In (F) ist eine regelmäßige Verteilung von Slit in den Mittelliniengliazellen nicht mehr zu erkennen.

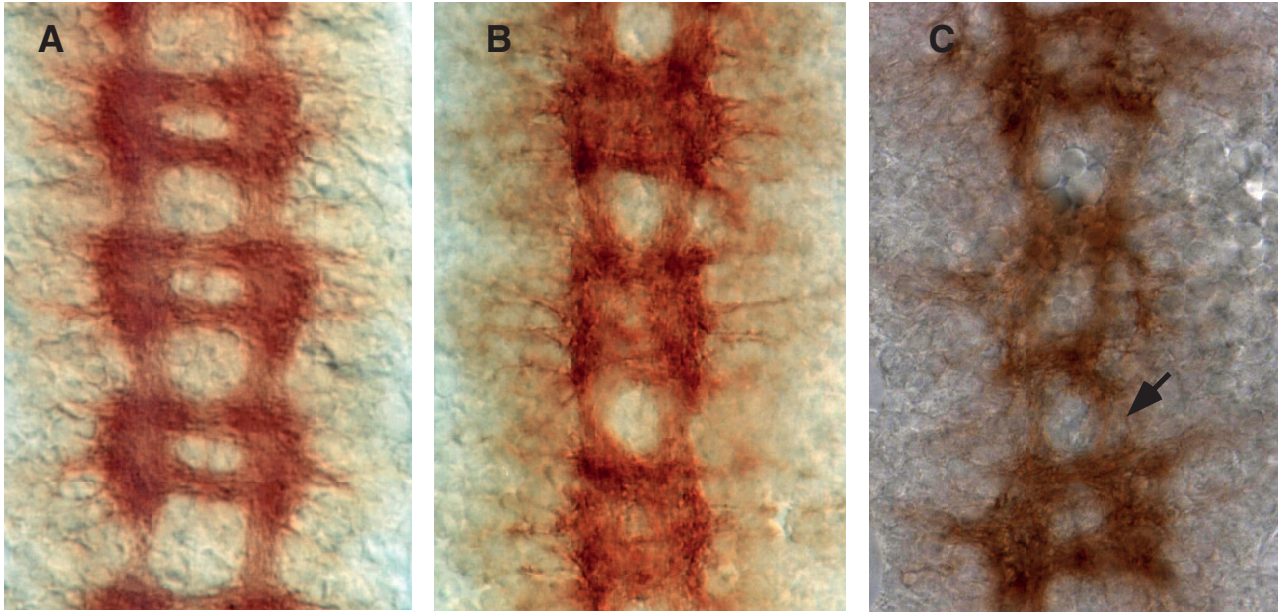


Abb. 11 *schizo* interagiert genetisch mit *sli*. Frontalansicht des ZNS von Embryonen im Stadium 16. Anterior ist oben. (A) Wildtyp (B) *sli*^{550-/-} (C) *schizo*^{C1-028-/-}; *schizo*^{C1-028-/-}/*sli*^{550-/-};+. (B) In hypomorphen *sli*⁵⁵⁰-Mutanten sind die Kommissuren partiell fusioniert und die Konnektive sind reduziert. (C) In homozygot mutanten-*schizo*^{C1-028} und heterozygot mutanten-*sli*⁵⁵⁰ Embryonen werden die Kommissuren teilweise wieder vollständig gebildet (C, Pfeil).

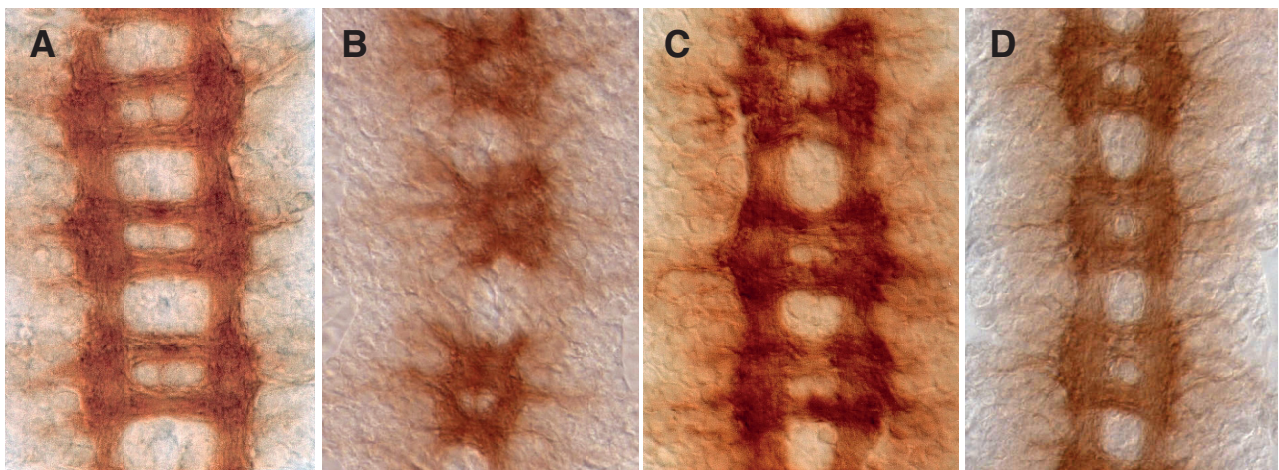
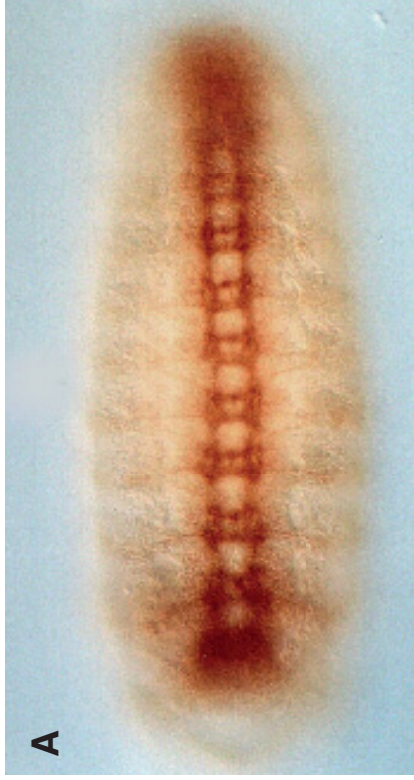


Abb. 12 Nachweis der genetischen Interaktion von *schizo* und *robo*. ZNS-Präparation von Embryonen des Stadium 16, Frontalansicht. Anterior ist oben. (A) Wildtyp. (B) *robo*^{O1-103-/-} (C) *schizo*^{C1-028-/-}; *schizo*^{C1-028-/-}/*robo*^{O1-103-/-};+ (D) *schizo*^{U112-/-}; *schizo*^{U112-/-}/*robo*^{O1-103-/-};+. In *robo*-mutanten Embryonen kreuzen die Axone mehrfach die Mittellinie, da sie nicht mehr in der Lage sind auf das repulsive Signal zu antworten (B). In homozygot *schizo*-mutanten Embryonen, denen eine Kopie *robo* fehlt, erscheinen die Kommissuren nicht mehr reduziert, sondern sehen fast wieder wildtypisch aus.



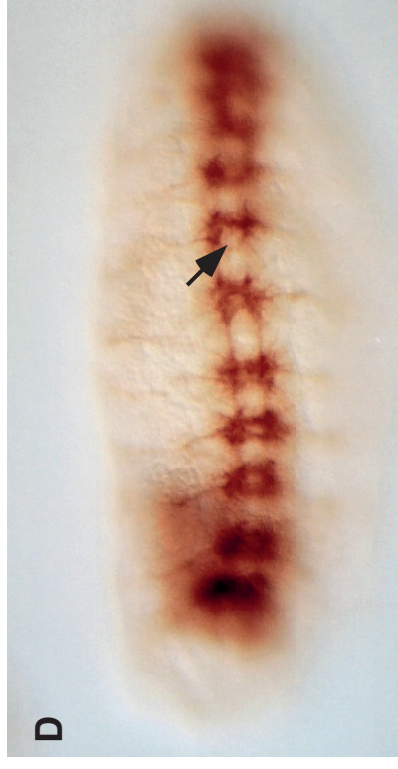
A



B



C



D

Abb. 13 *schizo* interagiert genetisch mit *Calmodulin*. *whole-mount* Antikörperfärbung mit BP102, anterior ist links. (A) Wildtyp. (B) Die *cam*-Mutante *l(2)k04213* zeigt einen leicht fusionierten Kommissurenphänotyp. In (C) ist die *schizo^{u112}*-Mutante zu sehen. (D) In doppelt mutanten *schizo^{u112}/cam*-Embryonen beobachtet man eine Verstärkung des Phänotyps. Das ZNS ist kondensiert und die Konnektive sind stark reduziert. In einigen Segmenten fehlt die anteriore Kommissur (Pfeil).

mutante Embryonen für *cam* und *schizo* führen zu einer Verstärkung des in den Einzelmutanten beobachteten Phänotyps. Die Konnektive sind stark reduziert und die Kommissuren sind fusioniert (Abb. 13D). In einigen Segmenten erkennt man, daß die anteriore Kommissur fehlt. Nach den bisherigen Ergebnissen wirkt *schizo* antagonisierend auf *slit* (siehe 3.1.3.4 und 3.1.3.5), wohingegen *cam* im Slit-Robo-Signalweg wirkt. In *cam/schizo*-Doppelmutanten würde man daher eine Abschwächung des *cam/schizo*-Phänotyps erwarten und keine Verstärkung.

3.1.4 Positionsdefekte in den Mittelliniengliazellen

Die Spezifizierung der Mittelliniengliazellen spielt eine wichtige Rolle in der kommissuralen Musterbildung (siehe Einleitung). Um zu analysieren, ob diese Gliazellen in *schizo*-mutanten Embryonen korrekt gebildet werden, wurden die Mittelliniengliazellen durch die Enhancer-Trap-Insertion P[*lacW*] *AA142* sichtbar gemacht. Im Wildtyp erkennt man 3-4 Mittelliniengliazellen pro Neuomer, die in dorsaler Position im ZNS zu liegen kommen. In *schizo*-mutanten Embryonen erkennt man an den Stellen, an denen die Kommissuren fehlen, häufig Positionsdefekte der Mittelliniengliazellen (Abb. 14). Diese Defekte wurden auch mit anderen Mittellinienglia-Markern beobachtet (siehe 3.1.3.2 und 3.1.3.3). In einigen Neuomeren, in denen die Kommissuren reduziert sind, sind die Mittelliniengliazellen im Vergleich zum Wildtyp in größeren Abständen positioniert (Abb. 14B). Es entsteht der Eindruck, daß in dem betroffenen Neuomer weniger Mittelliniengliazellen liegen.

3.1.5 PNS-Defekte in *schizo*-Mutanten

Im PNS unterscheidet man eine sensorische und eine motorische Komponente. Vom ZNS aus projizieren Motoaxone im segmentalen Nerv (SN) oder intersegmentalen Nerv (ISN) in die Peripherie des Embryos, um dort synaptische Verbindungen mit dem Muskeln zu bilden. Die Motoneurone des PNS und ihre sekundären Axone lassen sich mit dem Antikörper mAb 1D4 markieren. Im Wildtyp innerviert der SN die ventralen und lateralen Muskeln (Abb. 15A). In *schizo*-mutanten Embryonen erkennt man Projektionsdefekte in dem spezifischen

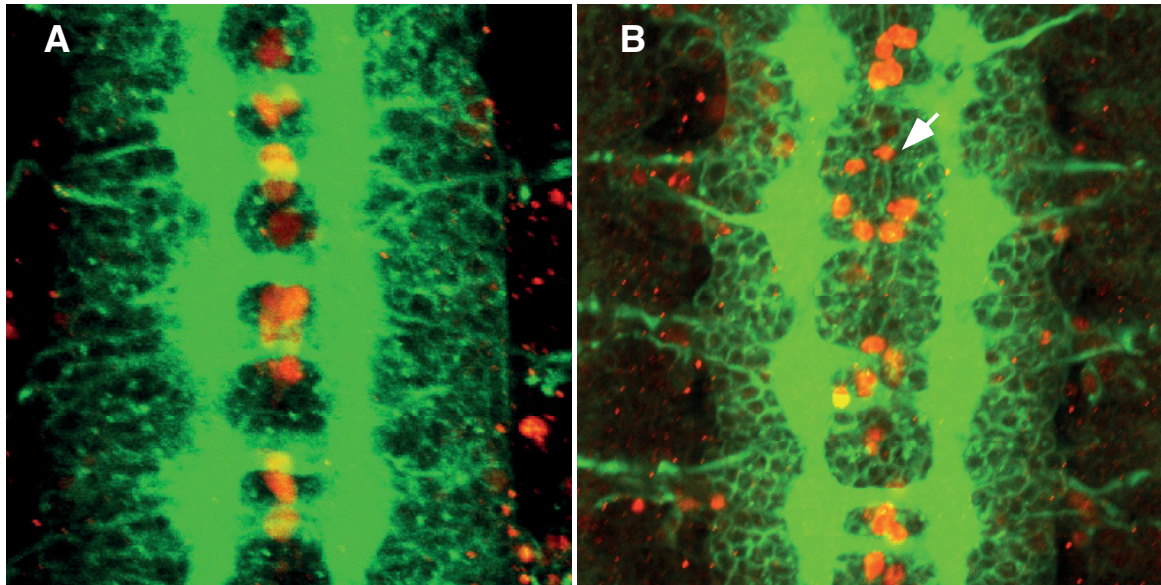


Abb. 14 Positionsdefekte der Mittelliniengliazellen in *schizo*-mutanten Embryonen. Frontalansicht des ventralen Nervensystems von Embryonen des Stadiums 16. Konfokale Färbung mit anti-HRP (grün) und anti-β-gal (rot). (A) Wildtyp, man erkennt pro Segment 3-4 Mittelliniengliazellen, die sich an der anterioren bzw. posterioren Kommissur befinden. (B) zeigt das *schizo*^{U112}-Allel. In *schizo*-mutanten Embryonen sind die Gliazellen in den Bereichen falsch positioniert, in denen die Kommissuren fehlen (Pfeil).

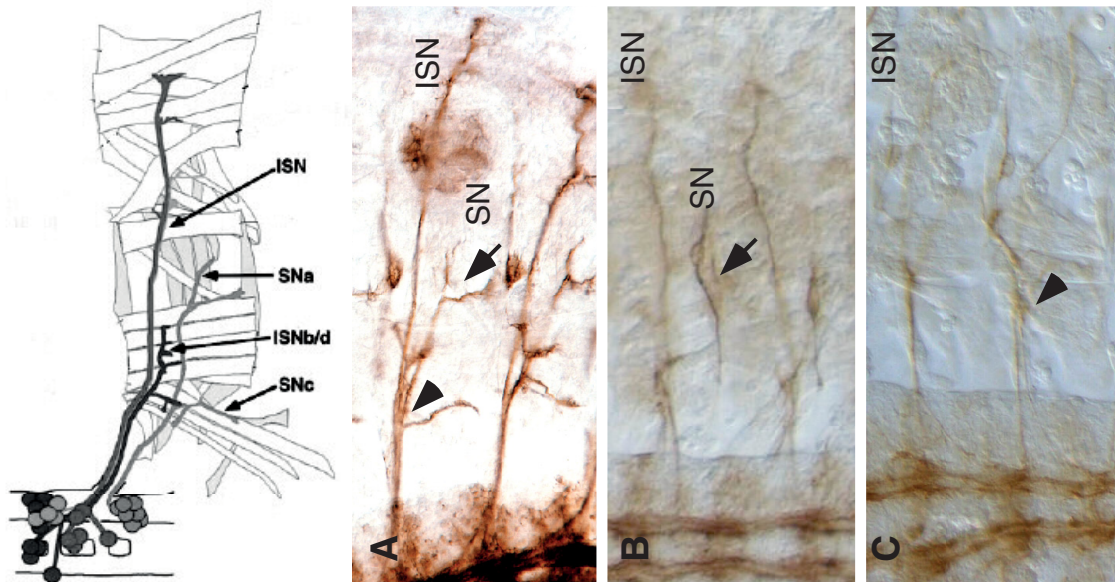


Abb. 15 Motoneurondefekte in *schizo*-mutanten Embryonen. Detailaufnahmen des PNS von Stadium 16 Embryonen. Die peripheren Motoneuron-Projektionen wurden mit dem mAb 1D4 (anti-FasII) sichtbar gemacht. Links ist eine schematische Übersicht des Intersegmentalen- (ISN) und Segmentalen-Nervs (SN) dargestellt. (A) Wildtypische Projektion. Man erkennt das spezifische Verzweigungsmuster der Motoneurone, die die Muskel innervieren (Pfeil). (B) *schizo*^{C1-028} und (C) *schizo*^{U112}. Der SN in *schizo*^{C1-028}-Mutanten bildet keine Verästelungen mehr wie es in wildtypischen Embryonen zu sehen ist (Pfeil). In *schizo*^{U112}-Mutanten scheint sich der SN nicht mehr vollständig vom ISN zu trennen so wie im Wildtyp (Pfeilspitze).

Verzweigungsmuster der Motoneurone. In *schizo*^{C1-028}-mutanten Embryonen sind die sekundären Axone des SN, die die Muskeln innervieren, reduziert (Abb. 15B), und in *schizo*^{C1-028}-Mutanten faszikulierte der SN mit dem ISN (Abb. 15C).

3.1.6 Migrationsdefekte in den peripheren Gliazellen

Das korrekte Auswachsen der peripheren Axone spielt auch eine wichtige Rolle für die Migration der peripheren Gliazellen im PNS (Sepp *et al.*, 2000; Sepp *et al.*, 2001). Geboren werden die peripheren Gliazellen am lateralen Rand des ZNS. Bevor die motorischen Axone in die Peripherie auswachsen, kontaktieren sie die peripheren Gliazellen, die vermutlich ein intermediäres Ziel für diese Axone darstellen. Wenn die peripheren Gliazellen beginnen, in das PNS zu wandern, so folgen sie den Pionier-Motoaxonen. Zur Charakterisierung der peripheren Gliazellen wurden homozygot mutante *schizo*-Embryonen mit dem anti-REPO-Antikörper gefärbt, der fast alle Gliazellen des Nervensystems erkennt. Im Wildtyp erkennt man in regelmäßiger Anordnung entlang der peripheren Motoaxone 6-7 Gliazellen pro Segment (Abb. 16A und B). In *schizo*-Mutanten sind die Gliazellen nicht mehr regelmäßig angeordnet (Abb. 16D, Pfeilspitze) und sie variieren auch in ihrer Anzahl. In manchen Segmenten scheinen weniger periphere Gliazellen auszuwandern (Abb. 16C und D, Pfeil).

3.1.7 Defekte im visceralen Mesoderm von *schizo*-Mutanten

Homozygot mutante *schizo*-Embryonen zeigen nicht nur neuronale Defekte, sondern haben auch einen Mitteldarmdefekt. Der Mitteldarm entsteht aus zwei getrennten endodermalen Anlagen am anterioren und posterioren Ende des Embryos, die während des Keimstreifenrückzugs in einer komplexen Bewegung aufeinander zuwachsen. Wie durch genetische Untersuchungen von Tepass und Hartenstein (1994) gezeigt werden konnte, hängt die Bildung des Mitteldarms von unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakten ab. Die Zellen, die den Mitteldarm bilden, müssen zunächst in Kontakt mit dem darunter liegenden visceralen Mesoderm treten. Nur die an das viscerele Mesoderm angrenzenden Zellen bilden ein polarisiertes Epithelium. Als nächstes ist die Interaktion zwischen den Mitteldarm bildenden

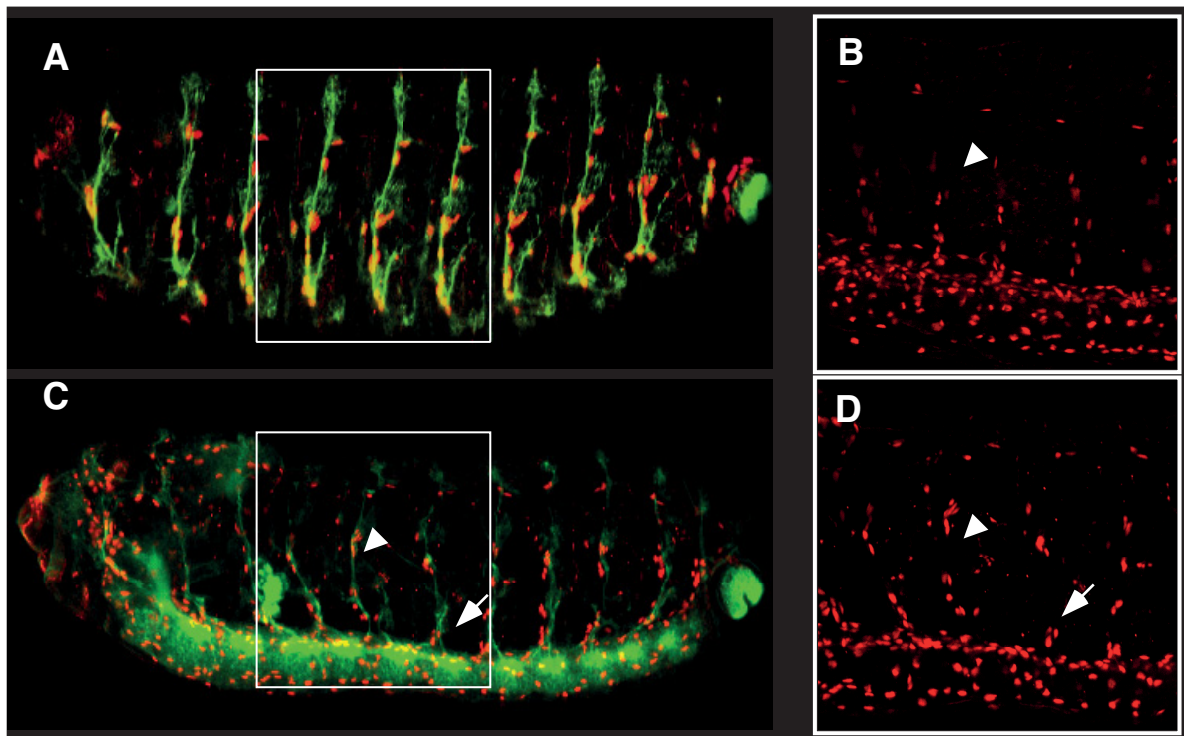


Abb. 16 Migrations Defekte der peripheren Gliazellen in *schizo*-Mutanten. Der unter 3.1.5 beschriebene PNS-Phänotyp führt auch zu Defekten in den peripheren Gliazellen. Markierung der Neurone und Gliazellen mit den Antikörpern HRP (grün) und Repo (rot), laterale Ansicht. (A) und (B) stellen den Wildtyp dar, wobei (B) eine Vergrößerung aus (A) ist, in der nur die peripheren Gliazellen zu sehen sind. (C) und (D) zeigen einen homozygot mutanten *schizo^{U112}*-Embryo. Die periphere Gliazellen sind nicht mehr in regelmäßigen Abständen angeordnet wie in (B), sondern weisen Migrationsdefekte auf (D, Pfeile).

Zellen von Bedeutung. Genetische Analysen haben gezeigt, daß das Homeobox-Gen *tinman* die Bildung des visceralen Mesoderms kontrolliert (Azpiazu & Frasch, 1993; Bodmer *et al.*, 1990). Das Gen *tinman* wird durch das mesodermale Gen *twist* aktiviert, und *tinman*-mRNA ist in allen mesodermalen Zellen zu finden. Nach der Gastrulation ist das Gen *decapentaplegic (dpp)* nur in dorsalen ektodermalen Zellen exprimiert (Johnston & Gelbart, 1987). Es konnte gezeigt werden, daß der Kontakt zwischen den *dpp*-exprimierenden ektodermalen Zellen und den darüberliegenden Zellen des visceralen Mesoderms wichtig für die Aufrechterhaltung der *tinman*-Expression ist (Frasch, 1995).

Als Marker für das viscerale Mesoderm diente Fasciclin III (FAS III). Der monoklonale Antikörper anti-FAS III bindet an die basolaterale Membran polar aufgebauter Epithelien und markiert unter anderem auch das viscerale Mesoderm (Patel *et al.*, 1987). *schizo*-mutante Embryonen zeigen Defekte in der FAS III-Expression des visceralen Mesoderms. Im Vergleich zum Wildtyp fehlen FAS III-positive Zellen des visceralen Mesoderms (Abb. 17C und D). Man beobachtet zusätzlich auch eine Fehlexpression von FAS III in *schizo*-mutanten Embryonen, das normalerweise nur basolateral exprimiert wird, besonders dort, wo die Zellen des visceralen Mesoderms nicht mehr als Band vorliegen. Dort, wo das viscerale Mesoderm jedoch noch halbwegs intakt ist, ist auch FasIII basolateral exprimiert (Abb. 17D, Pfeil).

3.2 Genetische und zytologische Lokalisation des Gens *schizo*

3.2.1 Meiotische Kartierung des *schizo*-Lokus

Mit Hilfe des Multimarkerchromosoms *rucuca* konnte *schizo* meiotisch auf den linken Arm des 3. Chromosoms kartiert werden. Es wurden daraufhin alle verfügbaren Defizienzen für das 3. linke Chromosom gegen die beiden *schizo*-Allele gekreuzt (siehe Anhang II), was zu einer Einschränkung des Bereichs auf die Region 78 führte. Zwei Defizienzen aus dieser Region waren in Transheterozygose mit den beiden *schizo*-Allelen letal: *Df(3L)Pc-MK* (78A3; 78D1-2) und *Df(3L)ME107* (77F; 78C8-9). Mittels weiterer kleinerer überlappender

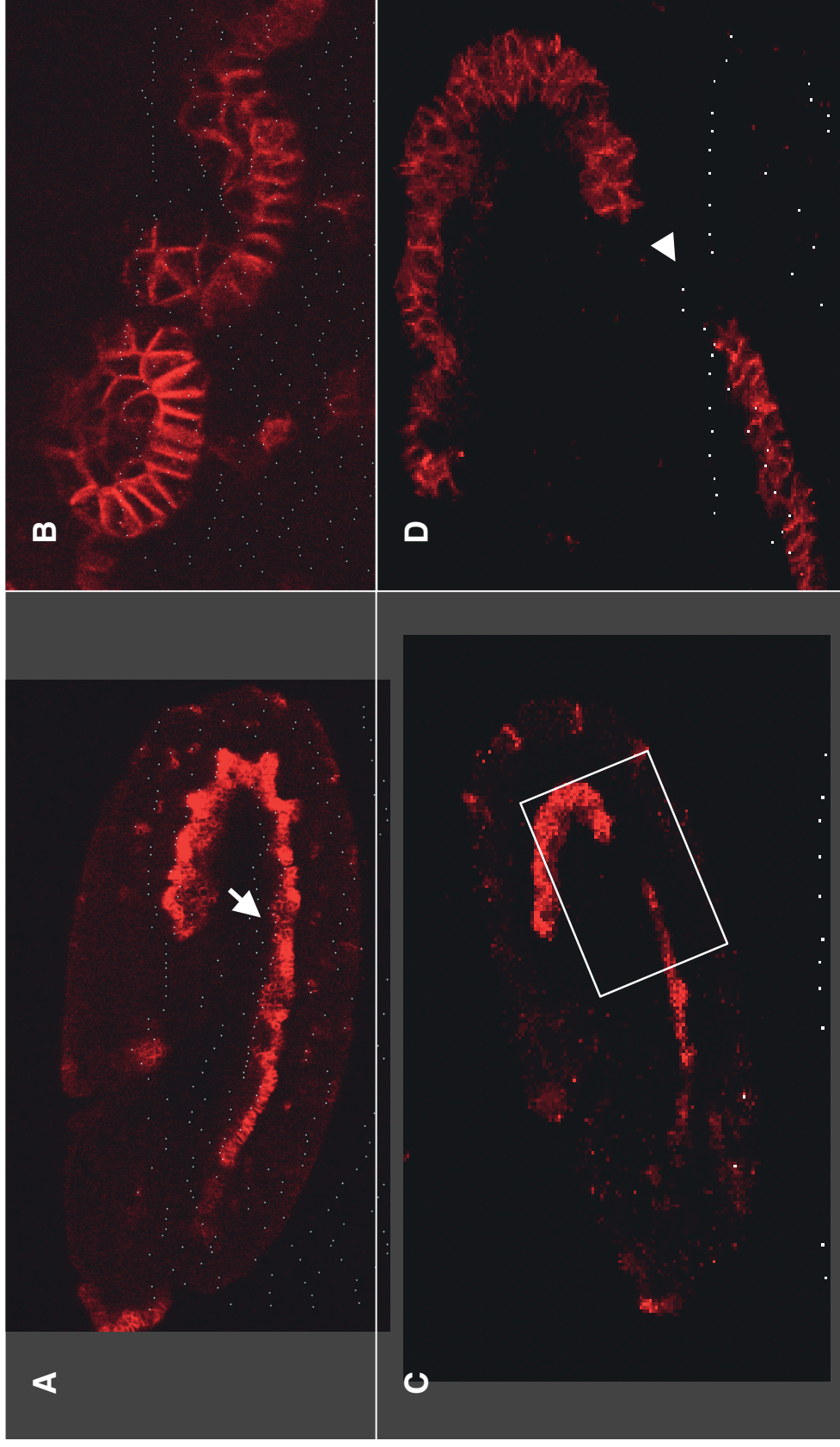


Abb. 17 Defekte im visceralen Mesoderm. Konfokale Färbungen mit dem anti-FasIII Antikörper an Stadium 10 *whole-mount*-Embryonen. (A) und (B) Wildtyp. Der anti-FasIII markiert das viscerele Mesoderm (Pfeil). (B) ist eine Ausschnittsvergrößerung aus (A). Hier sieht man die basolateral Expression von FasIII. (C) und (D) zeigen die *schizo^{U112}*-Mutante, in der es innerhalb des visceralen Mesoderms zum Verlust von FasIII-positiver Zellen kommt (Detailaufnahme in D, Pfeilspitze).

Defizienzen konnte die Letalität der *schizo*-Mutation auf die zytologische Region 78A-78B definiert werden (Abb. 18 und Tabelle 1).

3.2.2 Gene in der *schizo*-Region

Alle Defizienzen, die in Transheterozygose letal über die *schizo*-Mutationen sind, liegen in der Region 78A-C (Abb. 18). Die *Df(3L)ME178* ist die kleinste dieser Defizienzen. Defizienzen in der Region 78B-C komplementieren *schizo* (Tabelle 1). Die Lokalisation von *schizo* muß daher in dem Bereich 78A-B1 liegen. Abb. 19 zeigt die Gene, die laut „Berkeley *Drosophila* Genome Project“ (BDGP) in dieser Region liegen. Eines dieser Gene ist *poils aux pattes* (*pap*), das in der Region 78A2-5 liegt. Es ist auch als TRAP 240 bekannt (Boube *et al.*, 2000; Treisman 2001) und gehört zum RNA-Polymerase II-Transkriptionsmediator-Komplex, der mit dem Ligand-gebundenen Thyroid-Hormon-Rezeptor und Vitamin D-Rezeptor assoziiert ist (Fondell *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1999). In diesen Gen-Lokus inserieren die P-Elemente *l(3)rK760*, *l(3)L7062* sowie die EP-Elemente *EP(3)3375* und *EP(3)3443*, die in der 5'-Region von *pap* inserieren. Von dem *EP(3)3443* existiert eine Exzisionsmutante $\Delta 3443$, die das erste Exon von *pap* deletiert (E. Hafen, persönliche Mitteilung). $\Delta 3443$ komplementiert beide *schizo*-Allele. Es kann sich daher bei dem Gen *pap* nicht um *schizo* handeln. Für die Lokalisation von *schizo* bedeutet dieses Ergebnis, daß der *schizo*-Lokus proximal durch das „jump out“-Allel $\Delta 3443$ begrenzt wird. Der Phänotyp von *pap* ist in Abb. 20B dargestellt.

Das Gen *CG10585* kodiert vermutlich für eine Trans-Hexaprenyltransferase. Zu diesem Gen existiert eine Gruppe von „expressed sequence tags“ (EST) (Clot # 6829), deren Expressionsmuster mittels RNA-*in situ*-Hybridisierungen analysiert wurde. Das Gen *CG10585* wird ubiquitär während der Embryonalentwicklung exprimiert (Daten nicht gezeigt). Neben dem *CG10585* Gen liegt das vom BDGP vorhergesagte Gen *CG10584*. Im Anschluß daran befindet sich das Gen *sex-lethal interactor* (*sin*), dessen Genprodukt von Dong & Bell (1999) in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment als Interaktionspartner des Sex-lethal-Proteins identifiziert wurde. Die Expression des *sin*-Transkripts wurde nur in frühen

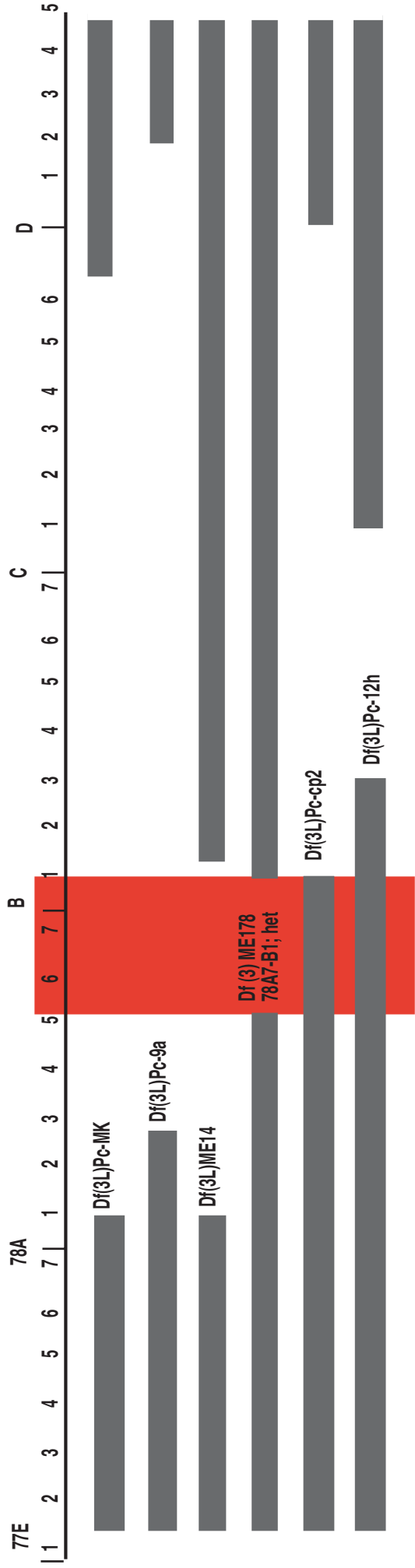


Abb. 18 Defizienzkarte der *schizo*-Region 78A-C. Mit Hilfe von überlappenden Defizienzen konnte der *schizo*-Lokus auf die zytologische Region 78 A-B eingegrenzt werden.

	Pc-MK	Pc-9a	ME14	ME178	Pc-cp2	Pc-12h
Pc-9a	letal	■				
ME14	letal	letal	■			
ME178	letal	letal	letal	■		
Pc-cp2	n.d.	n.d.	letal	v	■	
Pc-12h	letal	v	v	v	letal	■
<i>schizo</i> ^{U112}	letal	letal	letal	letal	v	v
<i>schizo</i> ^{C1-028}	letal	letal	letal	letal	v	v

Tabelle 1: Komplementationsanalysen

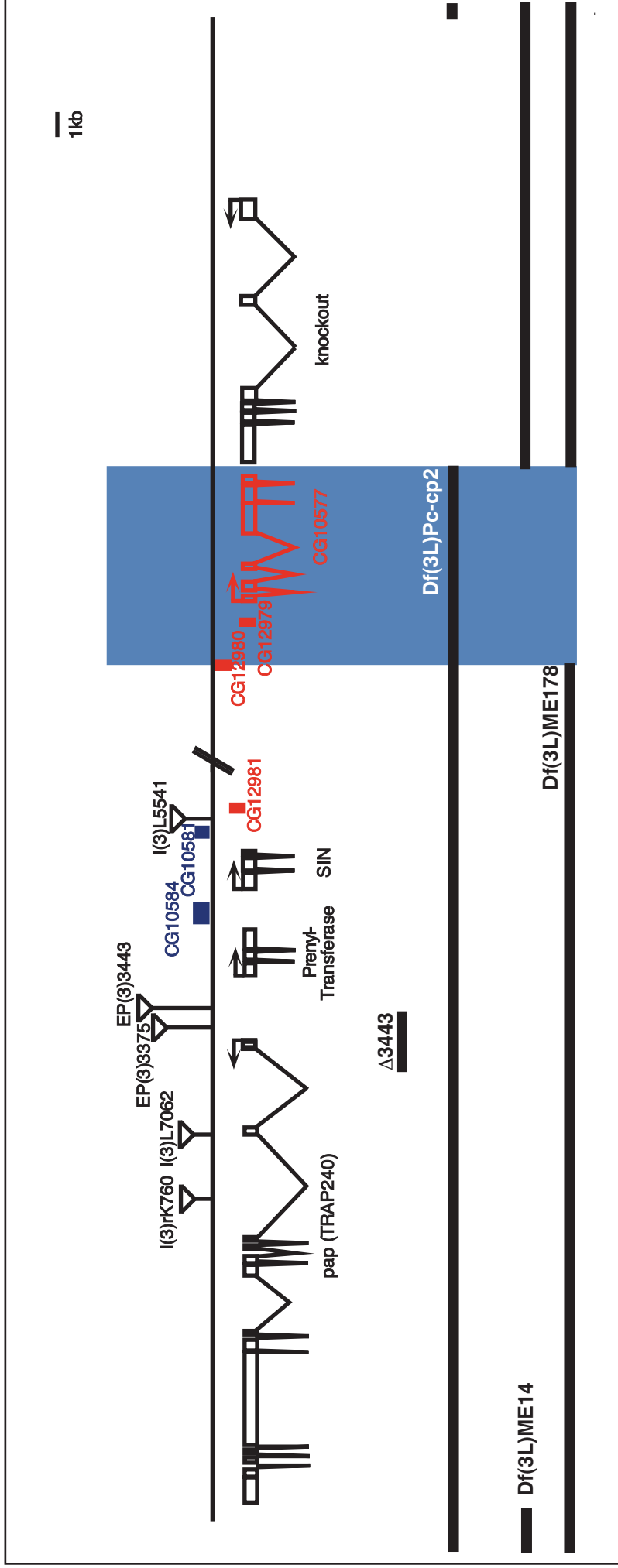


Abb. 19 Genomische Region um *schizo*. *schizo* komplementiert die beiden Defizienzen *Df(3L)ME14* und *Df(3L)ME178* in der Region 78A-B nicht. Es ist daher anzunehmen, daß *schizo* in den Bereich der kleineren Defizienz kartiert. In der Region 78A-B, die genomisch einen Bereich von ca. 50 kb umspannt, werden vom *BDGP* 10 Gene vorhergesagt. Das Gen *knockout (ko)* wird von der Defizienz *Df(3L)Pc-cp2* deletiert, die *schizo* komplementiert. Es kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei *schizo* um *ko* handelt. Für das Gen *poils aux pattes (pap)* existiert eine Exzisionsmutante $\Delta 3443$, die das erste Intron von *pap* deletiert und *schizo* komplementiert. Der *schizo*-Genlokus liegt daher zwischen den Genen *pap* und *ko*.

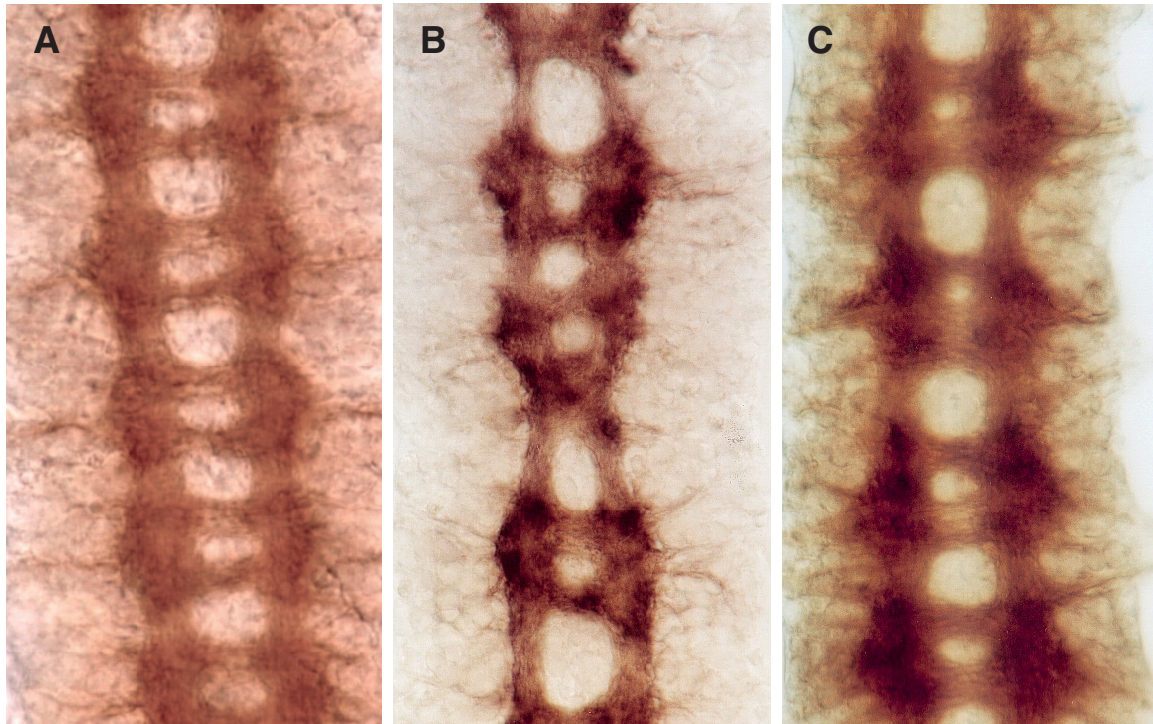


Abb. 20 Phänotypen der Exzisionsmutante $\Delta 3443$ und der Defizienz $Df(3)Pc-cp2$. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen nach Antikörperfärbung mit dem mAb BP102 und anschließender Immunhistochemie, anterior ist oben. (A) Wildtyp. (B) Phänotyp der $Df(3)Pc-cp2$, die das Gen *knockout* deletiert. Das ZNS erscheint verschmälert und die Kommissuren sind leicht fusioniert. (C) zeigt den Phänotyp der jump out-Linie $\Delta 3443$, die das Gen *Trap 240* mutiert. In $\Delta 3443$ -Mutanten sind die Kommissuren schwach fusioniert und nicht wie in *schizo*-Mutanten reduziert. Beide Mutationen komplementieren die *schizo*-EMS Allele und die gefundenen ZNS-Defekte bestätigen, daß es sich bei diesen Mutationen nicht um *schizo* handelt.

embryonalen Stadien beschrieben und ist nach Beendigung des Keimstreifenrückzugs nicht mehr nachweisbar. Es ist daher unwahrscheinlich, daß *schizo* von dem Gen *sin* kodiert wird. Vermutlich liegen in dieser Region noch vier weitere, kleinere Gene: *CG10581*, *CG12981*, *CG12980*, *CG12979*. Zwischen dem vorhergesagtem Gen *CG10581* und *CG12981* wurde die P-Insertion *l(3)L5541* lokalisiert (Abb. 19). Das vom *BDGP* vorhergesagte Gen *CG10577* wird über den cDNA Clot # 10447 definiert und weist eine konservierte Sec7-Domäne auf, die für den Austausch von GDP/GTP benötigt wird (siehe Einleitung). Auf Grund dieser Domäne wird angenommen, daß das Gen *CG10577* für einen Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor kodiert. Die dem Gen *CG10577* benachbarte Transkriptionseinheit kodiert das Gen *ko*, ein Zielgen des Transkriptionsfaktors *Krüppel (Kr)*. *ko* wird von der Defizienz *Df(3L)Pc-cp2* deletiert, deren Bruchpunkt sich am 3'-Ende des 2. Introns befindet (Hartmann *et al.*, 1997). Die Defizienz *Df(3L)Pc-cp2* komplementiert *schizo*, und homozygot defiziente *ko*-Embryonen zeigen keine reduzierten Kommissuren, sondern ein verschmälertes ZNS, dessen Konnektive reduziert sind (Abb. 20C). Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß *schizo* in die Region 78A5-B1 kartiert.

3.2.3 Komplementationsanalyse der P-Insertionsanalyse

Abb. 19 zeigt, daß sich in der Region 78A-78B fünf P-Insertionen befinden. Eine weitere P-Insertionslinie, *l(3)3*, deren Lokalisation nicht genau definiert ist, wurde von A. Carpenter erhalten. Die P-Insertionen und ihre cytologische Lokalisation sind in Tabelle 2 aufgeführt.

P-Element-Insertion	Lokalisation
<i>l(3)rK760</i>	78A1-2
<i>l(3)L7062</i>	78A2-3
<i>EP(3)3375</i>	78A5
<i>EP(3)3443</i>	78A5
<i>l(3)L5541</i>	78A5-6
<i>l(3)3</i>	78A

Tabelle 2: P-Element-Insertionen in der Region 78A-B

Außer der Linie *l(3)3* komplementieren alle P-Insertionen die beiden *schizo*-Allele. Es folgte eine phänotypische Analyse der Linie *l(3)3* mit dem mAb BP102 und mAb 1D4 (Abb. 21). Die mAb BP102-Färbung zeigt den *schizo*-Phänotyp. Homozygot mutante *l(3)3*-Embryonen haben reduzierte Kommissuren (Abb. 21B). Auch die Expression des Fasciclin II-Antigens in *l(3)3*-Mutanten zeigt ähnliche Defekte wie sie in *schizo*-Mutanten beobachtet wurden. Die longitudinalen Faszikel der Insertionslinie *l(3)3* scheinen defaszikuliert und weisen Defekte im äußeren Faszikel auf (Abb. 21D). Die Übereinstimmung der P-Insertions-Phänotypen mit denen der *schizo*-Mutation läßt vermuten, daß das P-Element der Linie *l(3)3* im *schizo*-Lokus inseriert ist.

3.2.4 Reversionsmutagenese der Linie *l(3)3*

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Phänotypen auf eine Insertion des P-Element *l(3)3* im *schizo*-Lokus zurückzuführen sind, wurde eine Reversionsmutagenese durchgeführt. Dazu wurde das P-Element mit Hilfe der $\Delta 2-3$ Transposase mobilisiert (siehe M&M). Die Selektion auf Exzision des P-Elements erfolgte mit Hilfe des im *l(3)3* P-Element inserierten *rosy*⁺-Augenmarkers. Ausgehend von 70 Fliegen, in denen ein Exzisionsereignis stattgefunden hatte, konnten vier vitale Exzisions-Chromosomen etabliert werden. Der Verlust des *rosy*⁺-Markers und die gleichzeitige Aufhebung der Letalität zeigen, daß eine P-Element-induzierte Mutation im *schizo*-Lokus vorliegt.

Um DNA-Sequenzen aus der *schizo*-Region zu erhalten, sollte durch eine inverse Polymerasekettenreaktion (I-PCR siehe M&M), die die P-Element-Insertion flankierende genomische DNA kloniert werden, um so den Insertionsort des P-Elements molekular zu bestimmen. Die Klonierung eines genomischen Fragments durch I-PCR war allerdings nicht möglich.

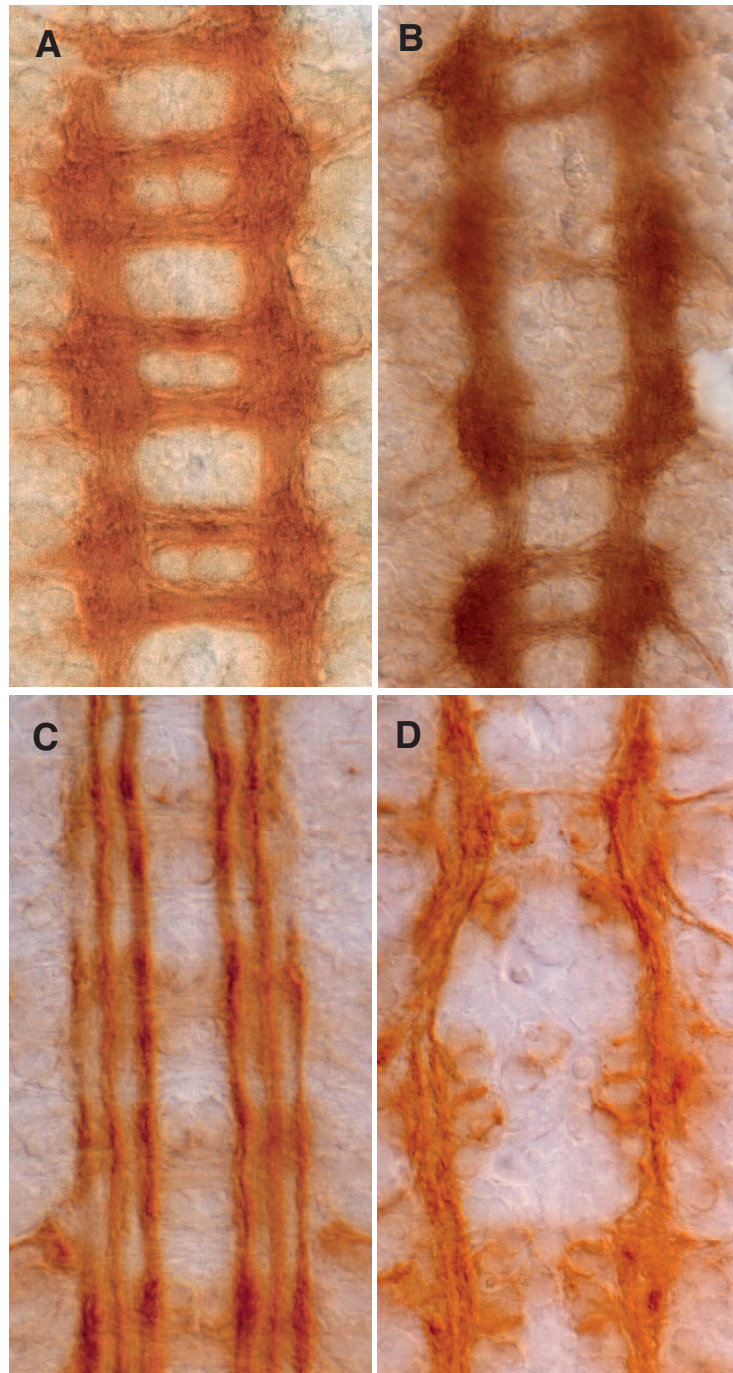


Abb. 21 Phänotypische Analyse der Mutante *schizo*^{*l(3)3*}. (A)-(D) ZNS-Präparation von Stadium 16 Embryonen. (A) und (B). Die Markierung der Axone erfolgte mit dem mAb BP102. In (C) und (D) wurden die longitudinalen Axone mit dem mAb 1D4 sichtbar gemacht. (A) und (C) zeigen den Wildtyp. (B) Die Kommissuren in der *schizo*^{*l(3)3*}-Mutante sind reduziert, wie in den *schizo*-EMS Allelen, dabei ist der Phänotyp der *l(3)3*-mutanten Embryon stärker ausgeprägt als der in *schizo*^{*C1-028*}-mutanten Embryonen. (D) In der mAb 1D4 Färbung erscheinen die Faszikel fusioniert und die äußerem Faszikel fehlen.

3.3 Molekulare Charakterisierung des *schizo*-Lokus

3.3.1 Isolierung genomischer Fragmente aus der Region um *schizo* und Identifizierung von Cosmid-Klonen

Die *l(3)3*-Insertion konnte nicht genau definiert werden. Es wurde deshalb versucht, auf andere Weise genomische Fragmente aus der *schizo*-Region zu isolieren. Dazu wurden die anderen P-Element-Insertionen in der Region 78 A-B mittels I-PCR und „*plasmid rescue*“ untersucht (Abb. 22A). Weiterhin stand eine Reihe von Cosmid-Klonen zur Verfügung, in denen verschiedene Bereiche der Region 78A1-78B2 kloniert vorlagen (Abb. 22B). Die Hybridisierung der P-Element-Insertionssequenzen an die Cosmid-Klone führte zur Isolierung der folgenden Fragmente. Das I-PCR-Produkt der Linie *l(3)rK760* hybridisiert an ein 2,8kb und 3,1kb großes EcoRI-Fragment des Cosmids DS07913. Das „*plasmid rescue*“-Fragment der P-Element-Insertion *l(3)L7062* hybridisierte an ein 8kb großes EcoRI-Fragment des Cosmid-Klones DS02721.

Parallel wurde mit den Fragmenten eine genomische Phagenbank gesichtet. Es wurden mehrere Phagen erhalten und anschließend subkloniert. Die DNA-Sequenzierung einzelner Restriktionsfragmente dieser Phagen ergab, daß sie aus der vom *BDGP* sequenzierten Region AC013164 stammen. Die erhaltenen Phagen wurden an genomische DNA der den *schizo*-Lokus aufdeckenden Defizienzen und der P-Insertionslinie *l(3)3* hybridisiert. Allerdings deckte keiner der Phagen einen Restriktionspolymorphismus (RFLP) in der Linie *l(3)3* auf.

3.3.2 Induktion neuer *schizo*-Allele und deren molekulare Charakterisierung

3.3.2.1 Erzeugung neuer P-Insertionen im *schizo*-Lokus

Mit Hilfe der sich in der Region 78A befindlichen EP-Elemente und den drei weiteren bekannten P-Element-Linien (Abb. 22A) wurde versucht, neue P-Element-induzierte *schizo*-Allele zu erzeugen. Dabei wurde sich die Neigung von P-Elementen zu Nutze gemacht, nach

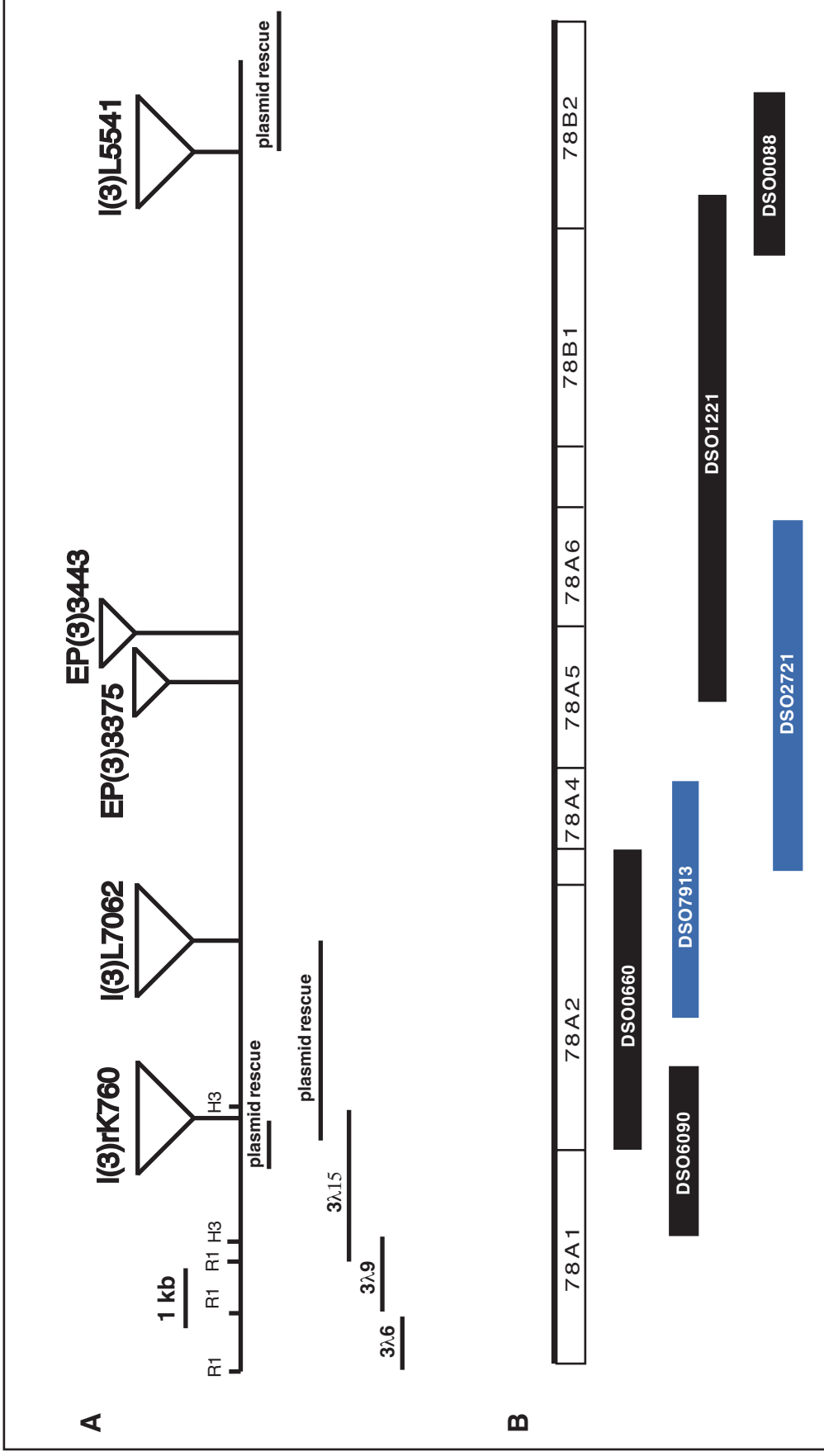


Abb. 22 Schematische Darstellung der Cosmid-Klone. (A) zeigt die P-Element-Insertionen, die sich in der *shizo*-Region 78A-B befinden. Ein Ansatz zur Charakterisierung der genomische Region von *shizo* bestand in der Isolierung genomischer Fragmente mittels "*plasmid rescue*" und I-PCR. Die erhaltenen Fragmente sind unterhalb der P-Element-Linien eingezeichnet. Ein weiterer Ansatz bestand in der Isolierung genomischer Phagen, die, wie sich später herausstellte, das Gen *pap* definieren. Eine zusätzliche Möglichkeit zur Isolierung genomischer Fragmente sind Cosmid-Klone. In (B) sind die Cosmid-Klone aus dem Bereich 78A-B gezeigt. Die "*rescue*"-Fragmente der P-Insertionen I(3)rK760 und I(3)L7062 hybridisieren an die Cosmid-Klone DSO7913 und DSO2721. Die Cosmide wurden daraufhin subkloniert und auf Restriktionspolymorphismen (RFLP) in *shizo*^{(3)B} getestet. Allerdings wies keiner der subklonierten Fragmente einen RFLP auf.

induzierter Exzision in benachbarten Regionen erneut zu inserieren (Zhang & Spradling, 1993). Durch Einkreuzen der $\Delta 2$ -3-Transposase wurden die P-Elemente mobilisiert und nach erneuter Integration auf Letalität gegen die beiden *schizo*-Allele getestet.

Bei allen Linien handelt es sich um P[*lacW*]-Elemente im *white*⁻-Hintergrund, bei denen eine neue Insertion anhand einer Veränderung der Augenfarbe zu erkennen ist. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Es wurde auch auf Exzisionsmutanten, die am Verlust der Augenfarbe zu erkennen sind, hin selektioniert. Insgesamt wurde nur eine *schizo*-mutante Exzisionsmutante erhalten (Tabelle 3). Alle P-Element-induzierten *schizo*-Allele sowie die Exzisionsmutante sind letal über beide *schizo*-Allele und zeigen in der mAb BP102 Färbung den mutanten *schizo*-ZNS-Phänotyp (siehe 3.3.2.2).

Ausgehend von der P-Insertion *l(3)L7062* wurden die neuen P-Element-Linien *P214* und *P224* erhalten. Von der Ausgangslinie *EP(3)3375* wurden drei neue *schizo*-P-Allele erhalten: *P35*, *P98* und *P119* und eine Exzisionsmutante $\Delta 73$. Für die P-Insertionsmutanten *P224*, *P214*, *P35* und *P98* sowie für Exzisionsmutante $\Delta 73$ konnten jeweils noch das 3'-Ende (*P224*, *P214*) bzw. das 5'-Ende (*P35*, *P98*, $\Delta 73$) des Ausgangs-P-Elements isoliert werden.

	angesetzte „jump in“	letale „jump in“	angesetzte „jump out“	letale „jump out“
I(3)L7062	397	2	139	keine
EP(3) 3375	325	3	240	1
EP(3) 3443	239	keine	135	keine

Tabelle 3: Induktion neuer P-Element-Insertionen im *schizo*-Lokus und Erzeugung einer Exzisionsmutante.

3.3.2.2 Reversionsmutagenese der induzierten *schizo*-P-Element-Insertionen

Eine Reversionsmutagenese (siehe M&M) sollte darüber Aufschluß geben, ob die Letalität der neu induzierten *schizo* P-Element-Insertionen tatsächlich auf die Integration der P-Elemente im *schizo*-Lokus zurückzuführen ist.

P-Insertionslinie	Anzahl der Kreuzungen	Revertanten
P224	100	8
P214	60	3
P98	55	1
P35	51	1
P119	30	0

Tabelle 4: Reversionsmutagenese.

Alle Revertanten waren über beide *schizo*-Allele lebensfähig. Für die Revertanten der P-Insertionslinien *P214* und *P224* konnte gezeigt werden, daß diese noch letal über die Ausgangsinsertion *l(3)L0762* waren. Aus der Reversionsmutagenese läßt sich ableiten, daß die Letalität der *schizo* P-Element-Allele tatsächlich P-Element-induziert ist. Es handelt sich folglich um echte P-Insertionen im *schizo*-Genloкус.

3.3.2.3 Phänotypische Untersuchung der erhaltenen „jump in“-Linien

Eine phänotypische Analyse der fünf neuen P-Element-induzierten *schizo*-Allele erfolgte mit Hilfe des mAb BP102 (Abb. 23B-F). Im Vergleich zum Wildtyp führen alle P-Element-Insertionen in Homozygose zu einer Reduktion der kommissuralen Axone wie sie in *schizo*-Mutanten beobachtet wurde (Abb. 23A). Bei den *schizo* P-Insertionen handelt es sich um hypomorphe Allele, deren Phänotypen schwächer ausgeprägt ist als der der *schizo*-EMS-induzierten Mutanten. Auch in der Exzisionsmutante $\Delta 73$ beobachtet man einen Verlust der kommissuralen Axone (Abb. 23E).

Die P-Element-induzierten *schizo*-Mutationen führen auch zu einem fusionierten Mitteldarm. Eine Analyse mit dem mAb 1D4 zeigte ähnliche Defekte im visceralen Mesoderm wie sie schon zuvor für EMS-induzierten *schizo*-Mutanten unter 3.1.7 beschrieben wurde (Daten nicht gezeigt).

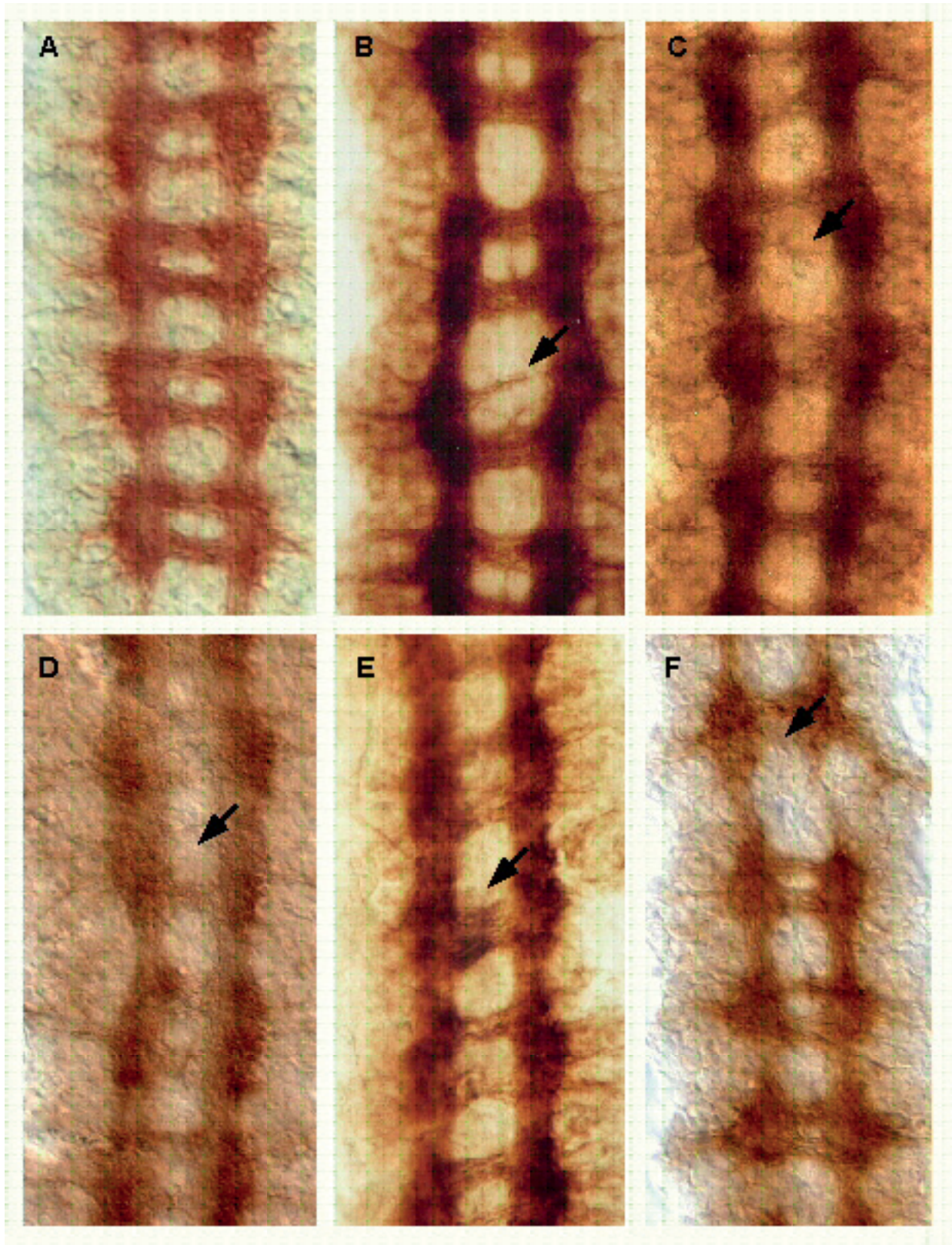


Abb. 23 Phänotypische Analyse der P-induzierten *schizo*-Allele. ZNS-Präparationen von Stadium 16 Embryonen nach Antikörperfärbung mit dem mAb BP102 und anschließender HRP-Färbung. (A) Wildtyp. (B)-(E) zeigen die Linien P119, P35, P98, $\Delta 73$ und P214. Die Commissuren in einigen Neuromeren sind reduziert (Pfeile).

3.3.2.4 Molekulare Charakterisierung der neuen P-Insertionen

Um die P-Element-induzierten *schizo*-Allele molekular zu definieren, wurde die Insertionssequenz der unter 3.3.2.1 beschriebenen P-Allele bestimmt. Bei der Linie *P224* ließ sich das 3'-Ende amplifizieren, und ein Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank des BDGP ergab, daß das P-Element ca. 5 kb vor dem Gen *CG12980* liegt (siehe Abb. 19). Dieses Gen wird über einen *EST*-Klon definiert, dessen 5'Ende 6,9 kb vor der *P224* Insertionsstelle liegt. Die Position der anderen P-Elemente konnte weder über I-PCR noch über „*plasmid rescue*“ bestimmt werden.

3.3.2.5 Southern-Blot Analyse der Linie *l(3)3*

Da sich die Integrationssequenz des P-Elements *l(3)3* über I-PCR nicht definieren ließ, wurde versucht, die P-Element-Insertion über Southern-Hybridisierung zu lokalisieren. Bei der Linie *l(3)3* handelt es sich um eine P[*PZ*]-Insertion, die das *rosy*-Gen trägt. Mit Hilfe einer *rosy*-spezifischen Sonde (siehe Anhang V) sollte versucht werden, sowohl das P-Element der Linie *l(3)3* als auch den Bruchpunkt der Translokation *T(3;4)11d*, die durch Reversion der Linie *l(3)3* mittels Röntgenstrahlen induziert wurde (A. Carpenter, persönliche Mitteilung), zu lokalisieren (Abb. 24). Für die Southern-Blot Analyse wurde genomische DNA aus wilotypischen Fliegen, *l(3)3*- und *T(3;4)11d*-Fliegen isoliert (siehe M&M). Im Anschluß daran erfolgte eine Restriktion der genomischen DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (PstI, EcoRV, EcoRI und SacI). In Abb. 24A ist das Ergebnis der Hybridisierung mit der *rosy*-Sonde zu sehen. Der SacI-Verdau zeigt einen deutlichen Restriktionspolymorphismus (RFLP) in *l(3)3* und *T(3;4)11d* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 24A, Pfeile). Aus dem 3kb großen SacI-Fragment im Wildtyp wird ein ca. 9kb SacI-Fragment in der Linie *l(3)3*. Dies entspricht der in der Restriktionskarte in Abb. 24C dargestellten Situation. Durch die P-Element-Insertion geht die SacI-Schnittstelle zwischen dem 3kb SacI-Fragment und dem angrenzenden, ca. 6,5kb großen SacI-Fragment verloren. Um den Insertionsort der Linie *l(3)3* genauer zu definieren, wurde die gesamte genomische Region in je 2 kb-Fragmente unterteilt (Anhang VII). Die LP4-Sonde zeigt, wie in Abb. 24B zu sehen, einen RFLP im PstI-Verdau

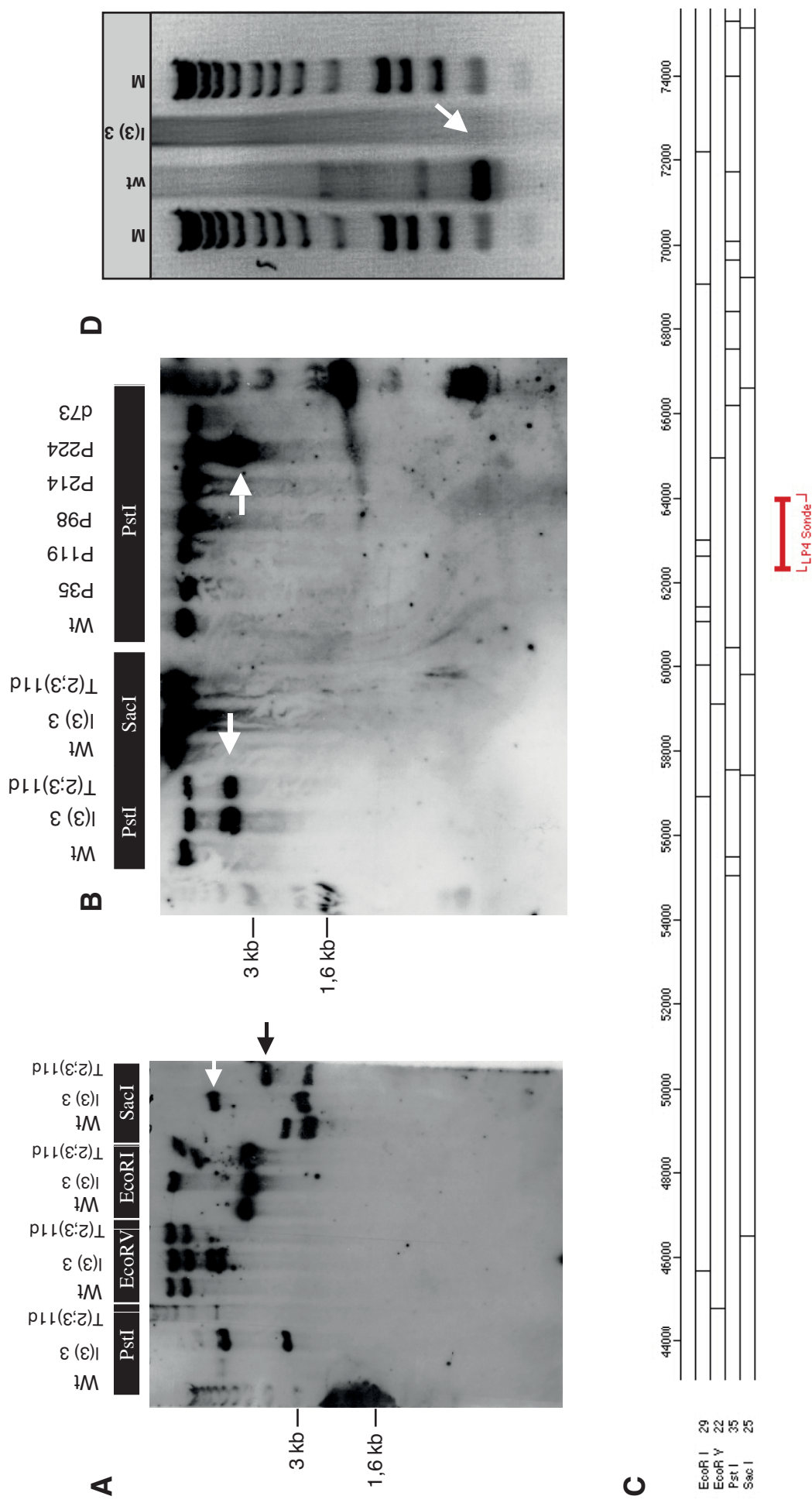


Abb. 24 Molekulare Charakterisierung des *schizo*-Lokus. (A) und (B) zeigen Southern-Blot-Analysen von der Mutante *schizo*⁽³⁾³, der Translokation *T(2;3)11d* und der neu induzierten *schizo*-Allele. (A) Restriktionspolymorphismen (RFLP) der P-Insertions-Linie *l(3)3* und *T(2;3)11d* nach Southern-Hybridisierung an genomischer DNA, die mit PstI, EcoRV und SacI restringiert wurde, mit der *rosy*-Sonde. (B) Hybridisierung mit der LP4-Sonde aus der *schizo*-Region (verwendete Primer für genomische Sonden siehe Anhang V). (C) Single-Embryo PCR an wildtypischen und homozygot mutanten *schizo*⁽³⁾³-Embryonen mit spezifischen Primern für das Exon 5. In *schizo*⁽³⁾³-Mutanten läßt sich das 5. Exon nicht mehr nachweisen. Es handelt sich folglich bei dem *schizo*⁽³⁾³-Allel um eine amorphe Mutation.

der Linien *l(3)3* und *T(3;4)11d*. Die erstellten Sonden für die Region in Abb. 24C wurden ebenfalls für die neu induzierten P-Linien getestet. Wie in Abb. 24B zu sehen ist, zeigt auch die Linie *P224* einen RFLP mit der LP4-Sonde im PstI-Verdau. Um die Bruchpunkte der P-Element-Insertionen zu bestimmen, erfolgte eine Hybridisierung mit der LP3- und LP5-Sonde (Anhang VII). Mit diesen an die LP4-Sonde angrenzenden Sonden konnte allerdings kein RFLP in den Stämmen *l(3)3*, *T(3;4)11d* oder *P224* beobachtet werden.

3.3.2.6 PCR-Nachweis des P-Insertionsorts der Linie *l(3)3*

Um den P-Insertionsort *l(3)3* im *schizo*-Gen näher zu bestimmen, wurden PCR-Experimente durchgeführt. Die Sonde LP4 kartiert in den Bereich des Intron 4 bzw. Exon 5 des Gens *CG10577*. Wenn sich die P-Insertion in diesem Bereich befindet, sollte sich die genomische Region mit Hilfe der PCR nicht mehr nachweisen lassen. Es wurde zunächst genomische DNA aus wildtypischen und homozygot mutanten *l(3)3*-Embryonen isoliert. Mit spezifischen Primern für das Exon 5 konnte im Wildtyp ein ca. 300bp großes Fragment amplifiziert werden (Abb. 24D). Dieses Fragment war in der Linie *l(3)3* nicht mehr nachweisbar (Abb. 24D, Pfeil). Das P-Element der Insertionslinie *l(3)3* befindet sich demzufolge im Exon 5 des *CG10577* und stellt wahrscheinlich ein amorphes *schizo*-Allel dar.

3.4 Sequenzierung und Expressionstudien der identifizierten cDNAs

In der Region, in der die P-Element-Insertionen *l(3)3* und *P224* lokalisiert wurden, liegen die vorhergesagten Gene *CG12980*, *CG12979* sowie der Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor *CG10577*. Für das *CG12980*, das für ein 945 bp großes Transkript kodieren soll, und das 1,3 kb große *CG10577* existieren jeweils zwei cDNAs, die diese Gene definieren.

3.4.1 Sequenzierung der cDNA-Klone GH10594 und LP01489

Beide cDNAs wurden vollständig sequenziert. Die LP01489 cDNA gehört zu der Transkriptionseinheit des Gens *CG12980* und ist ca. 4,5 kb groß. Die GH10594 cDNA, die

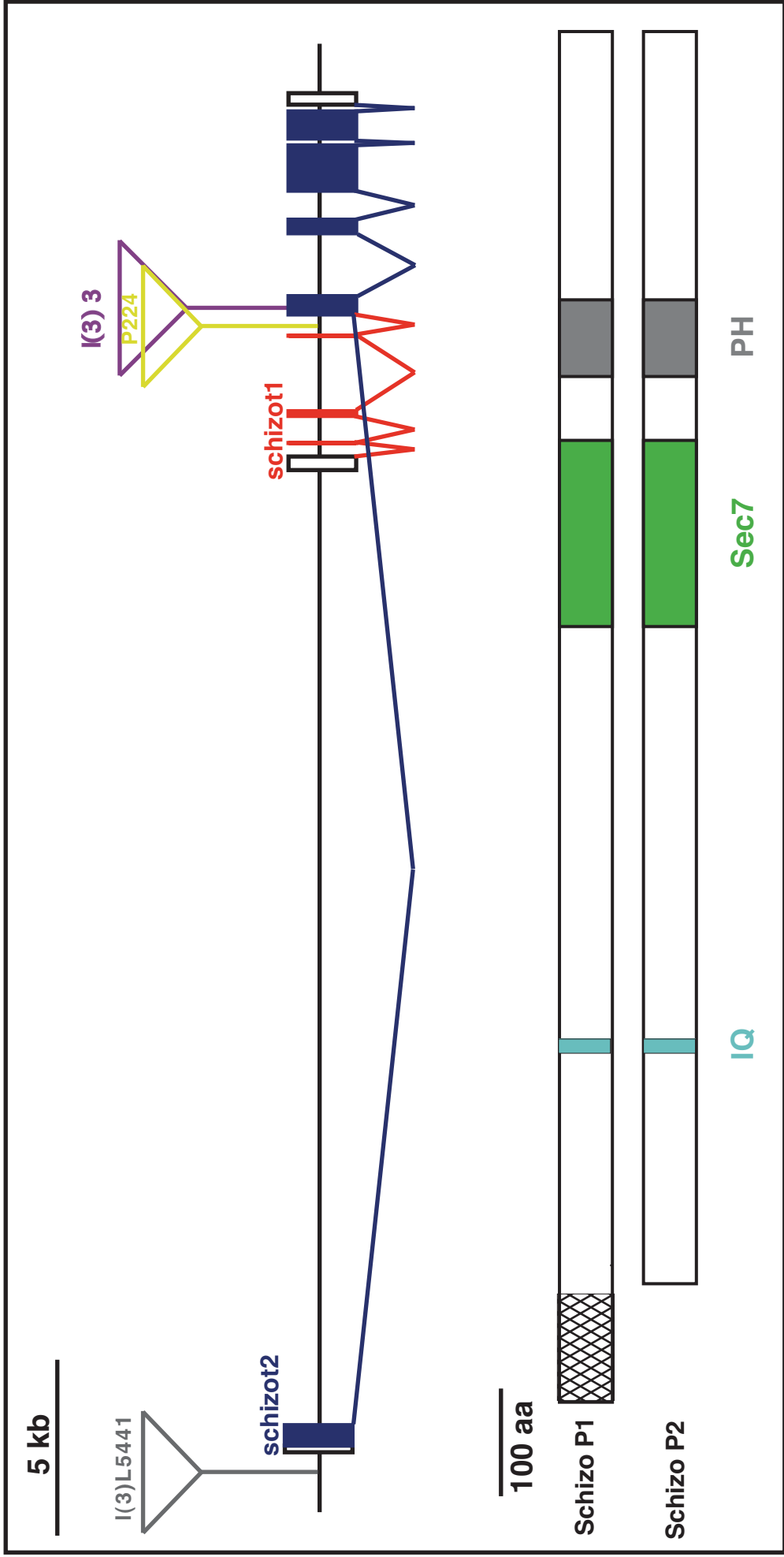


Abb. 25 Molekulare Charakterisierung von *schizo*. Schematische Darstellung des *schizo*-Genlokus (oben) und der daraus abgeleiteten Proteine. Oben: Die durch "*plasmid rescue*" charakterisierte P-Insertion P224 befindet sich im vierten Intron des *schizo t1*-Transkripts. Für die P-Insertionslinie *l(3)3* konnte gezeigt werden, daß sie im fünften Exon von *schizo t1* inseriert. Es handelt sich folglich um ein amorphes Allel. Unten: Die aus den cDNA Sequenzen abgeleiteten Proteine tragen drei konservierte Domänen: eine Calmodulin-bindende Domäne (IQ, türkis), eine Sec7-Domäne, die den Austausch von GDP/GTP katalysiert, (grün) und eine Membran-bindende, Peckstrin-homologe Domäne (PH, grau). Schizo P1 und P2 unterscheiden sich in ihrem N-terminalen Bereich.

```

AGCACACACGCTCGCTCGCTCGCTCGTCTGTTTTCGGTTCCGTTTTCGATTCACACCTTTGCGAGTCGTCGTTGGCAGCCTGCACGCGTTCGCTCGCCGATCGTCTTGTGTTTCAATATATTCAAAATATATTGTTTAATTAACGAGTTGG
150
CAAGCGAAAAGAAAACAAAAATGAATTTTAAATAAATCAATAAAAATTTGAAATTTGAGTGCTAAAACCGTACTTGAATTTGTGACCGAAATAGAAGTAATAACAAAAAAGAAATGAGCCGCGCGGCGAGCTCTTGGAAATCCCA
300
AAACTAACCAAAGATAAATGGCAAGAATGATGCGCAGACGCTCTGATAAATTAATAAGCCCAATCAACACACCAAGAAACAGCAAGAAAACAAATCAATTTGCAAAATGAATAACCGAAAGTAACCAACCAACCAAAAAGCGAAC
450
ACAAAGGGGAAATTCATAATAACAACAATAATAAAAAACACAATTCGATGACGAGCGTGAAGCCGAAATAAAAGCCATTTGCCCCCTTTCACCCCCGGAATCGATGAAGAATACCACAACCAACA T G TCCAGGTGTGACAAACCACA
600
M S R C D N H
AATCCCCGCCCAACAGCTGCCCGTTCGGCGCCCGTTCCTCCCACTCCAACTCCCTCGTCCCGCCTCGCAAGGACACCACCACCACCACCACCAGCTCCATTCGAGCAACTCGGATCTGGCGGCAGTGAGTCTCTCTGTC
750
K S R R Q Q L P V P A P L S S S H S N S S S S R S Q G H H H H H H H Q L H S S N S D L G G G S E S F L
AATATGACGCGATAGCGAAAAGAGCGCACCCGATTGTTGGTGTGGCGATGGCAGGAGCGGGTACGTCGGTGGTGCGCACCGCAACGCGGACGTCACGTCGTCGTCACCCGCGCACAAAGGAGACCCAGCAGCAC
900
Q Y C S D S E K R P P P I V V V V G D G R S R V R R V V R T A T R H V T V V S L S T R H K E T Q T H
CCTGCAACCATGTGACGCGCTGAGTTCGCCGAAAGAGCTGGAGCGAATGGTTCACCCAGTATGAGTGGTGGAGCGCAACAGCAGGATCAGCCAACGCCTCCACCTGCACAGATAGCGCGAGTGTGCGGGCTATGTTTACC
1050
T S H H V T A V S F P Q K S L E R S G S T Q Y E L A G A Q Q P G S A N A S T C T D S G S V G G Y V Y
TGCAGAATCACTACGCCCCGGCGCCAGCAGTCTCAGCGCCATCAACTACCTGCGCAACAGCATCCCCAGATGGTCTACAAATACAGCAGTATCCACGTCGCATCAGCAGCAGCAACAGCAGCCTCCAGCAGCAGCAGCATT
1200
L Q N H Y A P G A H S S S A A I N Y P A Q Q H P Q M V Y Q I Q Q Y P T C H Q Q Q Q Q H L Q Q Q Q H
TGATCAGACCGCGCAGTCACTACATGACAGTGCAGCGCAGCGGTTGGCCAGTATCATCCCATCACATGCTCCATGGTCAAGCGCATGCCCCCAATCAGCTGGGGCGTGGTCAATCGCCGGAGTGTGTGGGAACTGGCC
1350
L H Q T G A G H Y M Q V T A T G G G Q Y H H H H H M L H G H H H H A H H H G G A V V I A G S G V G T G
TGGGATCGAGCCACAGCGTATCATGACGACCCAGCAACAGCAGCAACAGAATATGCACAAGAAGAACTCCATCCGAAACCGCGAGATGTCCTCAAGCAACCGGAGTGTCTCAAGCAACCGGAGCTCAGTCCGCTCAGAACTCTCAGAACTCTG
1500
L G S G A T S V I M Q H Q Q Q Q Q Q N M H K K N S I R N G G D V L K R T R A Q S A Y E L S Q D L
TTGAAAACAGATCGAGCTGCTGAGCGCAAGTACGCGGAGTGCAGCCGTAAC CGACGGGCTACTATTCACGGCGCTTCGCTCAGTATGATGGTCAAGAAGTTCCGCTCGATCAGCGCAATGCCAAAGCTGAGAAGCGCTAA
1650
L E K Q I E L L E R K Y G G V R A R N A A V T I Q R A F R H Y M M V K K F A S I T A M A K A E K R L
GCCGGGATGGTGGTTACAGCAGCAGTCTGGATTCGGGAGGAGGTGCCCTCTCTGCTCAGCTACGAAAGTCCCAATTCAGTCCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGTGCACCA
1800
S R R M V V T A S S L G L A E E G A S S S A Y G S A T E S Q L T E Q Q Q Q Q Q A Q Q Q Q Q P R V T
TCATGCGGGTCCGGGAGGAGCCTTCCCGGGTTATCCCGGAGCCTTACCGCAGCTTCCCTTCCATGCGGGAGCGAGTCTGAGTGAGTCCATCAGCCGCTGAGTCACTAGCAGGAGCCTCCCGCTCCATATCGAGTCCGA
1950
I M A G P A G A A S P G L S R T P T R S L S M R E R R L D C S P I P R S Q S G A S P A S I S S S
CAGTCAGCAGTCCGGTCTGGCTCAGATCCATCACTTAACTGCTGCACGCGGACAGCAACATTAATAAAGCTCAGCAGTCCCGCAGCGAGTCTTACTACTACTAGTACCATGATCCAGCAGCTAGAGTCCAGCTG
2100
T V S T S A L A S H P H V N L L H A A E P H Y N A Q A L P Q G A A Y Y T S Y H G S P H D L S Y A S
CGCGGACACCTCGCTAAATGCTCGTGGTAAACAGAGCGCCACTCCCGCAGCCCTACTTATCGCGCGCGAGTATATGCGACCCAGGCGCGCAGCACCAGCCACAGCCAGTTCAGCTGAGCAGCAGTACCGCA
2250
S A D T S L N A S W V N T S G H S P H T P Y Y S A A Q I Y M R P K G G S T T P T P S C S G S T G S G
GCGGAGCAGCGGAGTGGCAGTACGCAAGAAGTCCACAGAGGTGCCAAACGCACAGTCCATTACGCGCACACAGCAGCAGCTTCTTTGCTGAGCGCGCAGACACCAGCGCTCCCTGCTGATAGGACCAATGGCTGT
2400
S G G S G S G S S K K V P P E V P K R T S S I T A Q Q Q T Q L L L L Q R Q T P P P P S L L R T N G L
GCAAAACCGCGAAGCAGCAGTCACTCCGTCAGAGTCCGGATTCCGGATTCTAGTGTACCTGCTGCGGAAACCAATTAACAGCAGTTCGGTCCGGATCCGATCACTACCACATACATGGAACAGGAAACAGCCCTAAATA
2550
C K T A E N G S L T S V Q T T S V S G S D S V T S A E R N L N S D L G S D R S N S P H T W K R G T A L N
GTTCCAGCAGTTCTCCACGACCTGGGGATTACGCGGTTGCGTGTGTTGGTAGAGTGGAGTGGTGGAGGAGCGCGCTTATGCGCTCAATGCGAGCTGCGCTTGCAGCAGCTACAGCAGCAGGAAATGCCACAGCGG
2700
S S Q Q F S T H S A D S A G A V S G G G V G V A G G A G V Y A A Q M Q A A V A A A T A A G G M P P A
ATGACCATGCTATCTCTGCATACGAGTCCCGCTCAGTATGAGCAGCATGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACCAATTCAGCGCGCAGTCCAGCTGCGGAGTGGCAGCAAACTACAAGATTCGGAGCAGTACGACAGCGCAGT
2850
D D H A I S S H T S A A Q Y E Q H E Q Q Q H E Q Q Q L Q A A A A A G V A Q N Y K M S E T I R K R Q
ATCGGCTGGATCAATCTGTAACAAGAAGCGGAGAGGGCATTCACTATGATCAGCGGGGATTCCTGGAATAACACCAGGCGTTCGCTGTTCTCTCATCACCCTAAGGTTTGGCCGCAAAATGATGGCAGTATC
3000
Y R V G L N L F N K K P E K G I T Y L I R R G F L E N T P Q G V A R F L I T R K G L S R Q M I G E Y
TGGAAAATGCAAGCAGTCAACATGGCGTCTCAGTGTCTTGGCATTGGAGCTGGACCTGCGCGCGCAAGTGGATGGTTCGAAAGTCCAGCCCTATTCGCGATGCTGGAGAGCAGCAAAAGATTGAGCAGCCTCA
3150
L G N L Q N Q F N M A M E L D L S G R Q V D V A L R K F Q A Y F R M P G E A Q K I E R L
TGGAGATCTTTACAGCGCTATTTGAATGCAATGCGACATTTGCGGCGATTGAGATCATCCGATACATCTCTCTGGCTTTCCGCATCATCTGAAACAGGATTCGACACACCCAACTAAAGCCGAGAACGTCGATGG
3300
M E I F S Q R Y C E C N A D I V G R L R S S D T I F V L A F A I I M L N T D L H T P N L K P E R R M
GCGTCGAGGATTTATCAAGAATTCGCGCGCATCGAGCAGTCTCAGCAGATTAAGAAGATGCTGATGGGACTATGACCGTGTCAAGTCCGAGAAATTAAGCCCGGCGGACCATGCACTCAAGTATGAGGTACAGGCCA
3450
R V E D F I K N L R G I D D C H D I D K D M L M G I Y D R V K S D E F K P G S D H V T Q V M K V Q A
CTATTGCGGCAAGAAACAAATTCAGCGCTGCCCATCGCGCTTGTCTGCTATTTGCCAGTGTACAGAGATCTCTGAGTGAACAGAAGGAGCGACTGGTGTGATCAGCGGAGGTTTCTGTTCAACGATCTGCTGCTATA
3600
T I V G K K P N L A L P H R R L V C Y C R L Y E I P D V N K K E R P G V H Q R E V F L F N D L L V I
CCAAATATTTAGCAAAAAGAGACCTCCGTGAGCTACACATCCGCAACAGTTCGCGCTATCGCGCACCGTGTGCACCTTCTGGACATGCCAACTATCCGTTTTCGATTCAGTCTCCCAAGAAATGGAATGGCAAGTCTTGATCA
3750
T K I F S K K K T S V T Y T F R N S F P L C G G T V V T L D M P N Y P F C I Q L S Q K Q G K I L I
CCTTCAACCGCCGCAACGACAGATCGTCAAGTTTCGCGAGGATTTAAGAGTCCATTAAGGATGAGTACGACGAGATGAGTACGCTGCGCATTGAGGCGAACTGGAGCGCAGTGGCGCGCAATCGAGCAGTGGCAATGCGG
3900
T F N A R N E H D R C K F A E D L K E S I S E M D E M E S L R I E A E L E R Q K S A R N R A P G N A
AGAATCTGACAGTGGCGTAGCCGATGTGAGGTCTGCCATGCCGATCAGCAAGATCAGCAGCATTCGGCAGCAGGTCCTCAGTTCGGATCAACAGTCCGCGATTAACAGCAGCAGTGAAGCGAGTGCCTGAGCAGCAGCTCTCTGCACATG
4050
E N R D S G V A D V E V C P C P Y Q Q G S Q A S G E Q A P N S A D N S Q Q L K R S A L S N S L L D M
ACGAGCAGTTGGCAATGAGAAACCTCAAGCTGTCGAGCAGTGGCTCCCTGGCAGCGGATGAGCATCTGCTCCAGTCCACTACAACATCCAGCGCTTGGAGGAAATGCGCGTGGCATGGCGCCGAGCAATGACAGTGCAG
4200
H E Q F G N E K P Q R R G S V G S L D S G M S I S F Q S T T T S S A S R E N A A A I A A A A N A A A
CAGCCAAGATGCGATTTAATAGCGCGCAACCGCAGCAGTTCGCCAGCCAGCAATGTGATGACGCTCGCGGAAATGCAAGCGTATCCATGCCAACTTTGTCAGCAGTACAGCGCGCTACATGTTGCAAGCAGCAAAATGCTCC
4350
A A K M R F N M P P T A I A I A R T P S N V Y A A P G M Q A Y T H A N F V Q S Q A A Y M L Q Q Q Q M L
AGCAGCAGCCAAATGCAAGCTCAGGCTCAGGCTCAAGCCCAAGCTCAGGCCCAAGCTCAAGCCAGGTCAGGCGAGCGCAGGCGAGCAGCGCTTACGGCAGAACTCCGCGAGCAGGAGGCGTTCGCGGACGGATGAGAAGC
4500
Q Q Q A Q M Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q P L T G R I P G R E R K A S R T D E N
GACGTCGACGGAGGCTAAGTATCTATTTAGTATTGAGCAAAGCATAAATATAATATCTATATAGCATAATGAATGAATACTGTATAATCCGAATCGAAACGACCCGAGCGCAATTTCTTCAACACCTAACCCAC
4650
G R S T E V .
ACACAGCTAGCAGATATAGTGAATTTAATGTTCCCTCGTCTCTGCTAATAATTAATGTAATAAAATTAACATTTGCTGTTTTACACTATCTACACACTAAAATTAAGTTTCAAACTATTGATATACATCAGCATACTATAA
4800
TACACCCACAATCTAATAAAATTTCTCTAATAATGACATATGATATTTGATATAACTTAATCCCTCAGCAGACTTGAACACCAATTTACCCCTGGCAACCTTCTATGCCCATACCCGTTTTGATCACCCTCCCTTACGAATT
4950
ACAAAAGCAGTTGGCGAAAGTGTTCATTAGCATATACTAAAAATATATCCCGATAAGTGCAGCTATGATATATATAATTTGTTTACCTACATTTTCTGCTGTAACAAAAAGTGAAGTTCGTTGATACCCTGTTGTTGTA
5100
TATACCTGAAATTAATAATTAAGCAATTTAGCTATAATTTATCATATTTATAGACCACCAAACTACCAAACTAAAAATTAATAACAGTATAACAACACAGGATATAGAAAAAAAACAATAATGATATGAAAAAGCAAAAGAC
5250
TTAAAAATTCATAATAAAGAAAATAATACCACA
5286

```

Abb. 26 Die *schizo t1* Nukleotid- und Aminosäuresequenz. Der offene Leseraster des *schizo t1*-Transkripts umfaßt 3944 bp und kodiert für ein 1313 aa großes Protein. Die Aminosäuresequenz des Schizo P1 weist drei konservierte Domänen auf: IQ- (türkis), Sec7- (grün) und PH (grau)-Domäne.

das Gen *CG10577* definiert, ist 3,6 kb groß. Eine Sequenzanalyse ergab, daß die LP01489 und die GH10594 cDNA-Klone von einem Genort stammen. Das erste der insgesamt sechs Exons des vom *BDGP* vorhergesagten Gens *CG10577* läßt sich jedoch nicht in den cDNA-Sequenzen wiederfinden. Die LP01489 cDNA umspannt demnach eine genomische Region von ungefähr 10 kb, in der die Gene *CG12980*, *CG12979* und *CG10577* liegen (siehe dazu auch Abb. 19).

Ein Vergleich mit der Sequenz der vorhergesagten Exons für die Gene *CG12980* und *CG12979* und der sequenzierten LP01489 cDNA zeigte, daß sich alle Exons der betreffenden Gene in der LP01489 cDNA-Sequenz wiederfinden. Dieser Befund legt nahe, daß es sich bei den drei vorhergesagten Genen nur um ein Gen handelt, das dem Gen *schizo* entspricht. Aus den Sequenzdaten läßt sich ableiten, daß das *schizo*-Transkript aus neun Exons und acht Introns besteht (Abb. 25). Der längste offene Leserahmen umfaßt 3944bp. Das Startkodon entspricht nur mäßig dem Translationsstartkonsensus CAAAACATG von *Drosophila* (Cavener, 1987). Dieser Leserahmen kodiert für ein 1313 Aminosäuren langes Protein (Abb. 25 und 26).

3.4.2 Identifizierung und Sequenzierung der cDNA-Klone RE44556, RE2256 und RE5442

Vom *BDGP* wurden EST-Klone einer neuen cDNA-Bank (RE-Bank) veröffentlicht. Darunter befand sich eine Gruppe aus drei cDNAs, deren 3'Ende mit dem 3'Ende der LP01489 cDNA übereinstimmte. Das 5'Ende befand sich allerdings 35 kb stromaufwärts. Die cDNAs wurden bestellt und ebenfalls vollständig sequenziert. Die Sequenz der drei cDNAs war identisch. Ein Vergleich mit der Sequenz der LP01489 cDNA zeigte, daß die RE44556, RE2256 und RE cDNAs ab dem zweiten Exon ebenfalls identisch sind (Abb. 25). Es handelt sich demnach bei den neu identifizierten cDNAs um eine alternative Spleißvariante des *schizo*-Transkripts. Es existieren folglich mindestens zwei *schizo*-Transkripte, die sich in ihrer Anfangssequenz unterscheiden. Das über die RE44556 cDNA definierte Gen wird vom *BDGP* als *CG32434* bezeichnet. Im Verlauf dieser Arbeit wird das *schizo*-Transkript, das über die LP01489 cDNA

definiert wird, als *schizo t1* bezeichnet. Vor dem CG32434 kartiert die P-Element-Insertion *l(3)L5541*, die ein β -Galaktosidase-Gen trägt und als Enhancer-Detektor dient. Das β -Galaktosidase-Expressionsmuster, das von diesem P-Element ausgeht, ist ähnlich wie das unter 3.4.3 beschriebene Expressionsmuster von *schizo*.

3.4.3 Expressionstudien der identifizierten cDNAs

Die Analyse der zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Expression der *schizo*-Transkripte sollte einen Hinweis darauf geben, ob die Expression mit den in *schizo*-mutanten Embryonen beobachteten mutanten Phänotypen korreliert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich die *schizo*-Transkripte *t1* und *t2* in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Aus diesem Grund wurden *whole mount*-RNA-*in situ*-Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen durchgeführt. Die mit den aus der LP01489, GH10594 und RE44556 cDNA generierten Sonden lassen das gleiche Expressionsmuster erkennen. Die in Abb. 27 und 28 zu sehenden RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurden mit Hilfe der LP01489 RNA-Sonde erstellt.

Die Expressionsdaten in Abb. 27 zeigen, daß das Gen *schizo* maternal exprimiert wird. In Abb. 27A erkennt man eine anfänglich ubiquitäre Expression während des zellulären Blastoderms, die kurze Zeit später spezifiziert wird (Abb. 27B). Das *schizo t1* und *t2*-Transkript wird im Mesoderm ab dem Stadium 7 exprimiert. Im Stadium 10 exprimiert eine Gruppe von ektodermalen Zellen das *schizo*-Gen. Am Ende der Embryogenese ist *schizo* in allen Zellen des ZNS exprimiert, auch in den Mittellinienzellen (Abb. 27C-F). Die Expression im ZNS deckt sich mit dem in *schizo*-Mutanten beobachteten ZNS-Phänotyp. Allerdings korrelieren die unter 3.1.5 und 3.1.6 beschriebenen Phänotypen im peripheren Nervensystem nicht mit der Expression der LP01489-Sonde. Es konnte keine Expression im PNS festgestellt werden. Eine Expression im visceralen Mesoderm konnte ebenfalls nicht nachweisen werden (siehe 3.1.7). Die Expression während der larvalen Entwicklung wurde nur mit Hilfe der LP01489 cDNA generierten Sonde untersucht. In Abb. 28A ist die Expression von *schizo* in der morphogenetischen Furche der Augen-Antennen-Imaginalscheibe zu sehen. Weiterhin erkennt man eine Expression im Notum der imaginalen Flügelscheibe (Abb. 28B).

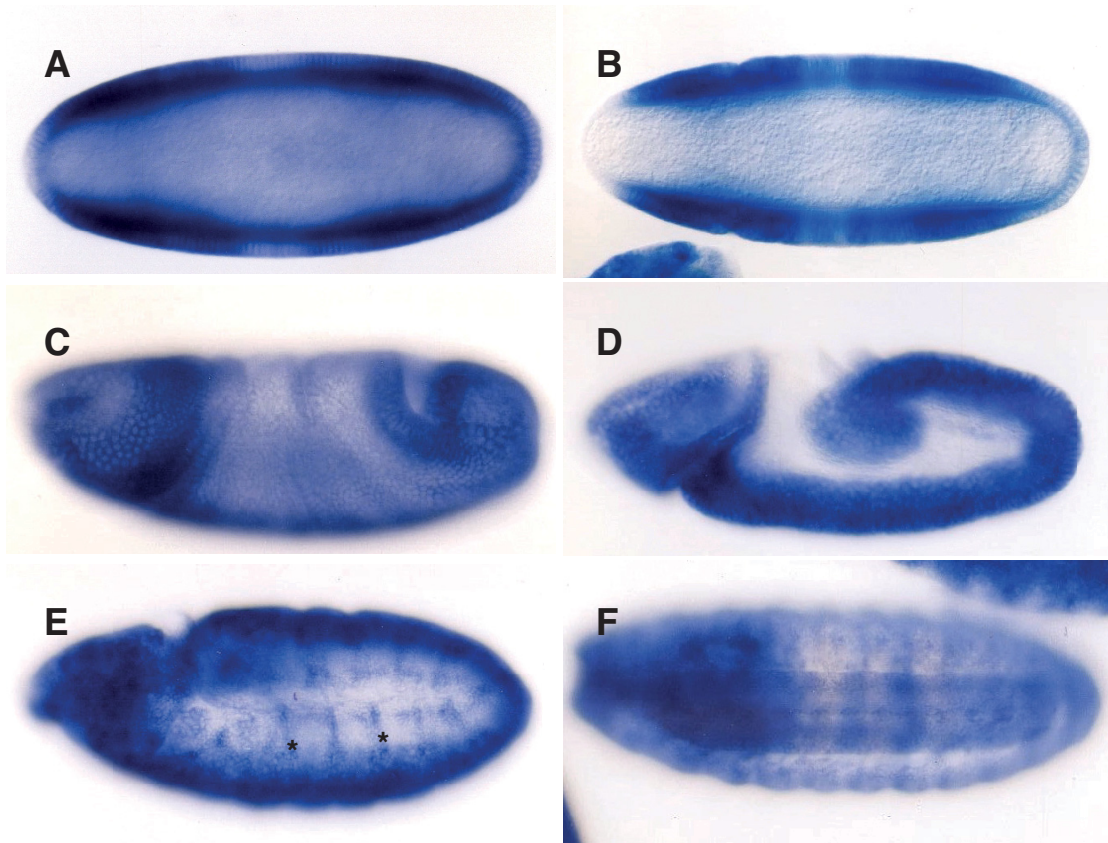


Abb. 27 Expressionsmuster des *schizo t1*-Transkripts. *Whole mount in situ*-Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde der LP01489 cDNA. (A)-(E) laterale Ansicht (F) ventrale Ansicht. Das *schizo t1*-Transkript wird im Wildtyp sehr früh im zellulären Blastoderm exprimiert und zeigt ein sehr dynamisches Expressionsmuster. In (A) und (B) sind Embryonen des späten Stadium 4 dargestellt, das *schizo t1*-Transkript ist zunächst ubiquitär exprimiert und wird dann reprimiert (B). In (C) und (D) sind Embryonen des Stadiums 7 und 8 zu sehen. Man erkennt eine Expression der *schizo t1*-RNA in der Kopfreion und dem Mesoderm. (E) Ab dem Stadium 10 findet man eine zusätzliche Expression in einer Gruppe von ektodermalen Zellen (Stern *). (F) Am Ende der Embryogenese im Stadium 16 ist eine Expression im ZNS zu sehen, sowohl in den neuronalen Zellen als auch in den Zellen der Mittellinie.

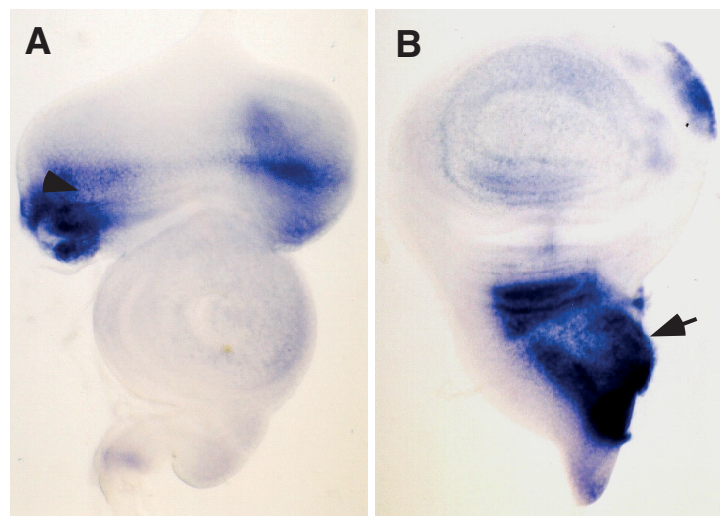


Abb. 28 *in situ*-Hybridisierung mit der *schizo t1*-RNA an Imaginalscheiben. (A) und (B) zeigen eine Augen-Antennen-Scheibe und eine Flügel-Imaginalscheibe, die mit der *schizo t1*-RNA-Sonde hybridisiert wurden. (A) Das *schizo t1*-Transkript wird in der morphogenetischen Furche exprimiert (Pfeilspitze). (B) Expression der *schizo*-RNA im Notum der Flügelscheibe (Pfeil).

3.5 SCHIZO als Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor (GEF)

3.5.1 SCHIZO besitzt drei konservierte Domänen

Das aus der Sequenz der LP01489 cDNA abgeleitete Protein (Schizo P1) umfaßt 1313 Aminosäuren. Sequenzhomologiesuchen mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Altschul *et al.*, 1998) ergaben, daß Schizo P1 drei konservierte Proteindomänen enthält (Abb. 25): eine IQ- (Calmodulin-), eine Sec7- und eine Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne. Das von der RE44556 cDNA-Sequenz abgeleitete Schizo P2-Protein besteht aus 1132 aa und enthält ebenfalls alle drei oben erwähnten Proteindomänen. Proteine mit einer Sec7-Domäne katalysieren den Austausch von GDP/GTP an einer Familie von kleinen GTP-bindenden Proteinen, den ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs).

Schizo-Homologe lassen sich in verschiedenen Spezies finden. So konnten mittels Homologiesuche zwei humane Schizo-Homologe identifiziert werden: EFA6 (Perletti *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 1999) und ARF-GEP₁₀₀ (Someya *et al.*, 2000), die eine 32%ige und 40%ige Homologie zu den Schizo-Proteinsequenzen zeigen (Abb. 29) und ein Anopheles-Homolog, daß eine 80%ige Homologie zu Schizo P1 und P2 zeigt (Abb. 30).

EFA6, auch als PSD bekannt, und ARF-GEP₁₀₀ wurden beide aus einer Gehirn-cDNA-Bank isoliert. EFA6 besitzt neben der Sec7-Domäne noch eine coiled-coil-Region und eine PH-Domäne, wohingegen ARF-GEP₁₀₀ genau wie SCHIZO eine IQ-, Sec7- und PH-Domäne besitzt. ARF-GEFs unterscheiden sich stark in ihrer Primärsequenz. Innerhalb der Sec7-Domäne gibt es zwei wichtige konservierte Motive, Motiv 1 und 2, die sich zu einer hydrophoben Schleife falten und die, wie für den GEF ARNO (Chardin *et al.*, 1996) gezeigt werden konnte, mit der ARF1 GTPase interagiert (Béraud-Dufour *et al.*, 1998; Cherfils *et al.*, 1998; Mossessova *et al.*, 1998). In Tabelle 5 sind die Motive 1 und 2 mit denen der anderen Sec7 GEFs verglichen. EFA6 und ARF-GEP₁₀₀ sind in den Motiven der Sec7-Domäne weniger stark konserviert. Auch Schizo weicht leicht von den konservierten Motiven ab, zeigt aber größere Homologien zu ARF-GEP₁₀₀ als zu EFA6. Von beiden humanen Homologen ist

1 M S R C D N H K S R R O O L P V P A P L S S H S N S S S R S Q G H H H H H H L Q L H S S N S D L G G S E S F L O Y C S D S E K K R P P I V V V V G D G R S R R V R T A T R H V T V S L S T R H K E T O T H T S H Schizo P1
1 M L - - - - - Schizo P2
1 L - - - - - Anopheles
111 H V T A V S F P O K S L E R S G T O Y E L A G A O O P G S A N A S T C T D S G V G Y V Y L O N H Y A P G A H S S A A I N Y P A Q O H P Q M Y V I O Q Y P T C H Q O O O O H L L Q R Q T P P P P S L L R T Schizo P1
2 - - - - I P O K S L E R S G T O Y E L A G A O O P G S A N A S T C T D S G V G Y V Y L O N H Y A P G A H S S A A I N Y P A Q O H P Q M Y V I O Q Y P T C H Q O O O O H L L Q R Q T P P P P S L L R T Schizo P2
2 - - - - Anopheles
221 A T G G G Q Y H H H H H L H G C H C H H A H H H G C A V I A G S G V G T G L G S G A T S V I M H O O O O O Q N M H K K N S I R N G D V L K R T R A Q S A Y E L S Q D L L E K O I E L L E R K Y G V R A R N A A V T Schizo P1
107 A T G G G Q Y H H H H H L H G C H C H H A H H H G C A V I A G S G V G T G L G S G A T S V I M H O O O O O Q N M H K K N S I R N G D V L K R T R A Q S A Y E L S Q D L L E K O I E L L E R K Y G V R A R N A A V T Schizo P2
2 - - - - H K K G S I R N M G D V L K R T R V Q N A Y E L S Q D L L P K O I E L L E R K Y G V R A R N A A P T Anopheles
331 I Q R A F R H Y - M M V K K F A S I T A M A K A E K L S R R M V T A S S L G L A E G A S S S A Y G - - - - - S A T E S Q L T E Q Q Q Q O O O O P R V T I M A G P A G A A S P G L L - - S R T P P T R Schizo P1
217 I Q R A F R H Y - M M V K K F A S I T A M A K A E K L S R R M V T A S S L G L A E G A S S S A Y G - - - - - S A T E S Q L T E Q Q Q Q O O O O P R V T I M A G P A G A A S P G L L - - S R T P P T R Schizo P2
53 I Q R A F R H Y - M M V K K F A S I T A M A K A E K E M S R E V F T P P R T V R S A S S V S V R R K Y S F S C E I Y I C C T K N A V F S N E P - - - - - F P K L I S S I S A T P P G T L H H R V T P V R Anopheles
428 S L S M R E R R Q L D C S P I P R S O G - A S P A S I S S S T - - - - - V S T S A L A - - - - - S H P H V N L L H A A E P H Y - - - - - Y N A O A L P O G A A - - - - - Y T S Y H G S P H D L Schizo P1
151 S M S L R E R R - L D S P I P R S O G T A S P A P V P I T R S O G T A S P A P A Q O O Q Y S H P H V N L H Q Q A Q L A G Y T S A V S A Q S H A V V M H H P H P H Q Q Q Q Y Q S Q Y G S Q D L N V Schizo P2
504 S Y A S S A D - - - - - T S L N A S W N T S G H S P H T P Y - - - - - Y S A A O I Y M R P K G G S T P T P S C S G S T G S G S G S G S K K V P P E V P K R T S S I T A Q O O T Q L L L L Q R Q T P P P P S L L R T Schizo P1
390 S Y A S S A D - - - - - T S L N A S W N T S G H S P H T P Y - - - - - Y S A A O I Y M R P K G G S T P T P S C S G S T G S G S G S G S K K V P P E V P K R T S S I T A Q O O T Q L L L L Q R Q T P P P P S L L R T Schizo P2
260 S G A S S G S Q L D S T Y S E M N L S W N Q T A S T H Q S P Y T P P Y T A A Q I Y M E R F G I G T - - - - - G S G G S G S T S A G G R K V P P E V P K R T S S I T P G G Q Q - - - - - H T P S R S L R P Anopheles
605 N G L C K T A E N G S L T S V O S S G D S S V T S A E R N L N - - - - - S D L G S D R S N S P H T W K R - - - - - G T A L N S S - - - - - Q Q F S T H - - - - - S A D S A G A V S G G G V G A G G A V Y A A Q M O A A V A A Schizo P1
491 N G L C K T A E N G S L T S V O S S G D S S V T S A E R N L N - - - - - S D L G S D R S N S P H T W K R - - - - - G T A L N S S - - - - - Q Q F S T H - - - - - S A D S A G A V S G G G V G A G G A V Y A A Q M O A A V A A Schizo P2
355 N G L C K T A E N G S L T S V O S S G D S S A S A G V G I E M I G G G G G S S D R S S S P C - W K R K G P G E S S Q S G I T L L P A Q S P B H M L L S A T D G T V V G G A G R S I H S T V A T A T A T A S Anopheles
698 A T A A G G M P P A D D H A I - - - - - S S H T S A O Y E Q H E Q Q H E Q Q O O L O A A A A A G V A Q N Y K M S E T I R K R Q Y R V G L N L F N K K P E K G I T Y L I R R G F L E N T P Q G V A R F L I T R K G L S R Q Schizo P1
584 A T A A G G M P P A D D H A I - - - - - S S H T S A O Y E Q H E Q Q H E Q Q O O L O A A A A A G V A Q N Y K M S E T I R K R Q Y R V G L N L F N K K P E K G I T Y L I R R G F L E N T P Q G V A R F L I T R K G L S R Q Schizo P2
464 G A B T G S A N V T I T S E E S E C H S S H T S A O Y S H M E C H D O I V H - - - - - T P T S Y R V S E T I R K R Q Y R V G L N L F N K K P E R G I T Y L I R R G F L E N T P Q G V A R F L I T R K G L S R Q Anopheles
803 M I G E Y L G N L Q N F N M A V L S C F A M E L D L S G R V D V A L R K F O A Y F R M P G E A K I E R L M E I F S Q R Y C E C N A D I V G R L R S S D T I F V L A F A I M L N T D L H T P N L K P E R M R V E D F Schizo P1
689 M I G E Y L G N L Q N F N M A V L S C F A M E L D L S G R V D V A L R K F O A Y F R M P G E A K I E R L M E I F S Q R Y C E C N A D I V G R L R S S D T I F V L A F A I M L N T D L H T P N L K P E R M R V E D F Schizo P2
564 M I G E Y L G N L Q N F N M A V L C F A E L D L S G Q V D V A L R K F Q V E R M P G E A Q K I E R L M E V P S A R Y C G M S D I V A R L R S H D T V F L A F A I I M L N T D L H T P N L K P E R M R C D D F Anopheles
913 I K N L R G I D D C H D I D K D M L M G I D R V K S D E F K P G S D H V T Q V M K V Q A T I V G K K P N L A L P H R R L V C Y C R L Y E I P D V N K K E R P G V H Q R E V F J F N D L L V I T K I F S K K S V T Y T F Schizo P1
799 I K N L R G I D D C H D I D K D M L M G I D R V K S D E F K P G S D H V T Q V M K V Q A T I V G K K P N L A L P H R R L V C Y C R L Y E I P D V N K K E R P G V H Q R E V F J F N D L L V I T K I F S K K S V T Y T F Schizo P2
674 V K N L R G I D D C H D I F D M L I G I Y P R V R A W E F P G S D H V T Q V M K V Q A T I V G K K P N L A L P H R R L V C Y C R L Y E I P D I N K K E R P G V H Q R E V F J F N D L L V I T K I F S K K K S I S V T Y T F Anopheles
1023 R N S F P L C G T V V T L L D M - P N Y P F C I Q L S K V D G K I L I T F N A R N E H D R C K F A E D L K E S I S E M D E M E S L R I E A E L E R Q K S A R N R A - P G N A E N R D S G V A D V E V C P C Y Q Q G S - - - Schizo P1
784 R N S Y L C G I V V T L L D V P N Y F C I L S Q K V D K L V T F F A R N E H D R C K F A E D L E S I S E M D E M E T L R I E A L E L E R Q K S A R G C G T R T N S E N R D S G V A D V E V C A G P Y P G A G V P Anopheles
1129 - - - - - Q A S G E O A P N S - - - - - A D N S Q O L K R S A L S N L L D M H E O F G N E K P O R R G S V G L D S G M S I S F O S T T S S A S R E N A A A I A A A A A A A A A A A K M R F N M P P T A A T A P S N V Y Schizo P1
1015 - - - - - Q A S G E O A P N S - - - - - A D N S Q O L K R S A L S N L L D M H E O F G N E K P O R R G S V G L D S G M S I S F O S T T S S A S R E N A A A I A A A A A A A A A A A K M R F N M P P T A A I A T P S N V Y Schizo P2
894 G L L V P G S V G F V S P F E C G L A H T H S E F A Q L R S A S N S L L D M H E O F G N E K P O R R G S V G L D S G M S I S F Q S T S A T G S R S D Anopheles
1229 A A P G M O A Y T H A N F V Q O S Q A A Y M L O Q O O Q L O O A O M O A O A O A O A O A O A Q P L T G R I P G R E R K A S R T D E N G R S T E V . Schizo P1
1115 A A P G M O A Y T H A N F V Q O S Q A A Y M L O Q O O Q L O O A O M O A O A O A O A O A O A O A Q P L T G R I P G R E R K A S R T D E N G R S T E V Schizo P2
970 A A P G M O A Y T H A N F V Q O S Q A A Y M L O Q O O Q L O O A O M O A O A O A O A O A O A O A Q P L T G R I P G R E R K A S R T D E N G R S T E V Anopheles

Abb. 30 Aminosäuresequenzvergleich von Schizo P1 und P2 mit *Anopheles*. Schizo P1 und P2 weisen eine 80%ige Homologie zur *Anopheles*-Proteinsequenz ENSANG0000003834 auf. Die konservierten Domänen sind farbig unterlegt. (IQ- türkis, Sec7- grün und PH-Domäne grau).

bekannt, daß sie spezifisch an ARF6-GTPasen wirken (Franco *et al.*, 1999; Someya *et al.*, 2000). Es ist daher anzunehmen, daß auch Schizo an ARF6 bindet.

	<u>Motiv 1</u>	<u>Motiv 2</u>
Schizo	FRMPGE ▼	VLAFAIIM LNTDLH
EFA6	LALMGE	TLTCALMLLNTDLH
GEP ₁₀₀	IRV QGE	I LAFAI IL LNTDMY
ARNO ₃	FRL PGE	VLSFAVIM LNTSLH
Gnom	FRL PGE	VLSYSIIM LNTDQH
Gea1	FRL PGE	VLSYSIIM LNTDSH
Sec7	FRL PGE	VLSYSLIM LNTDLH

Tabelle 5: Sequenzvergleich der beiden hoch konservierten Motive der Sec7-Domäne von *Drosophila* Schizo (diese Arbeit), menschlichem EFA6 (Perletti *et al.*, 1997), ARF-GEP₁₀₀ (Someya *et al.*, 2000), ARNO₃ (Chardin *et al.*, 1996), *Arabidopsis* Gnom (Shevell *et al.*, 1994), Hefe Gea1 (Peyroche *et al.*, 1996) und Sec7 (Achstetter *et al.*, 1988). Diese Motive bilden vermutlich eine hydrophobe Schleife, die mit der ARF-GTPase interagiert. Das Glutamat im Motiv 1, das am Nucleotid-Austausch beteiligt ist, ist in allen Sec7-GEFs konserviert und mit einer Pfeilspitze markiert.

3.5.2 Die Expression des Schizo P1-Proteins im Wildtyp

Schizo P1 und P2 unterscheiden sich in ihrem N-terminalen Ende, das kaum konserviert ist. Gegen das N-terminale Ende von Schizo P1 wurde ein Peptid-Antikörper generiert (siehe Anhang IX). Die bisher erhaltenen Expressionsdaten mit dem polyklonalen anti-Schizo-Antikörper sind in Abb. 31 zu sehen. Es wurden verschiedene Konzentrationen (1:50 bis 1:5000) des aufgereinigten Peptid-Antikörpers getestet. In den frühen embryonalen Stadien 4 bis 10 zeigt die Expression von anti-Schizo eine ähnliche Expression wie das *schizo*-Transkript. Das Protein wird schon früh während des Blastoderm-Stadiums exprimiert und

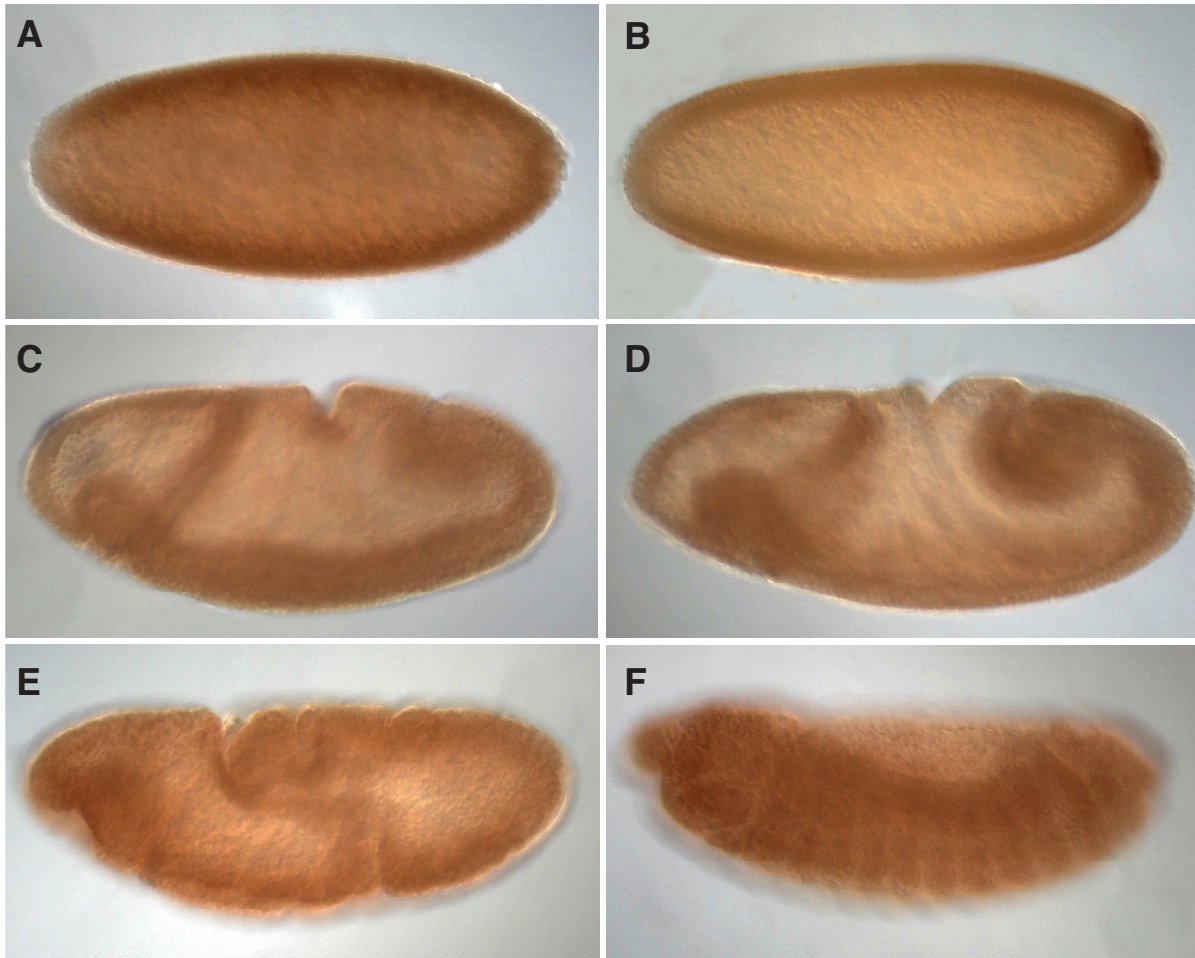


Abb. 31 Expression von Schizo P1 in Wildtyp-Embryonen. Antikörperfärbung an *whole mount*-Embryonen mit dem anti-Schizo P1 Antikörper in einer 1:50 Verdünnung. (A)-(F) Laterale Ansicht. (A) und (B) zeigen Embryonen des Stadium 4 und 5. Schizo P1 wird im zellulären Blastoderm-Stadium und in den Polzellen exprimiert. Im Stadium 8 (C), (D) und im Stadium 10 (E) wird Schizo P1 in der Kopfregion, im Mesoderm und in der Anlage des anterioren und posterioren Mitteldarms exprimiert. Ab dem Stadium 13 ist Schizo P1 epidermal exprimiert (F). In späteren Stadien erkennt man keine spezifische Expression von Schizo P1 im ZNS und in den Zellen der Mittellinie.

1	MGK	L	L	S	K	I	F	G	N	K	E	M	R	I	L	M	L	G	L	D	A	A	G	K	T	T	I	L	Y	K	L	K	L	G	Q	S	V	T	ARF51F		
1	MGK	V	L	S	K	I	F	G	N	K	E	M	R	I	L	M	L	G	L	D	A	A	G	K	T	T	I	L	Y	K	L	K	L	G	Q	S	V	T	ARF6-Ratte		
41	T	I	P	T	V	G	F	N	V	E	T	V	T	Y	K	N	V	K	F	N	V	W	D	V	G	G	Q	D	K	I	R	P	L	W	R	H	Y	Y	T	G	ARF51F
41	T	I	P	T	V	G	F	N	V	E	T	V	T	Y	K	N	V	K	F	N	V	W	D	V	G	G	Q	D	K	I	R	P	L	W	R	H	Y	Y	T	G	ARF6-Ratte
81	T	Q	G	L	I	F	V	V	D	C	A	D	R	D	R	I	D	E	A	R	T	E	L	H	R	I	I	N	D	R	E	M	R	D	A	I	I	L	I	F	ARF51F
81	T	Q	G	L	I	F	V	V	D	C	A	D	R	D	R	I	D	E	A	R	Q	E	L	H	R	I	I	N	D	R	E	M	R	D	A	I	I	L	I	F	ARF6-Ratte
121	A	N	K	Q	D	L	P	A	M	K	P	H	E	I	Q	E	K	L	G	L	T	R	I	R	D	R	N	W	Y	V	Q	P	S	C	A	T	S	G	D	ARF51F	
121	A	N	K	Q	D	L	P	A	M	K	P	H	E	I	Q	E	K	L	G	L	T	R	I	R	D	R	N	W	Y	V	Q	P	S	C	A	T	S	G	D	ARF6-Ratte	
161	G	L	S	E	G	L	I	W	L	T	S	N	H	K	L																									ARF51F	
161	G	L	Y	E	G	L	T	W	L	T	S	N	Y	K	S																									ARF6-Ratte	

Abb. 32 Identifizierung eines ARF6-Homologes in *Drosophila*. Mit Hilfe der ARF6-Sequenz der Ratte wurde durch Datenbankanalyse ein Homolog in *Drosophila* identifiziert, das auf dem 2. Chromosom liegt und als ARF51F (CG8156) bezeichnet wird. Es zeigt 96% Homologie zu ARF6 der Ratte (untere Proteinsequenz). Konservierte Aminosäuren sind durch schwache Schattierungen hervorgehoben.

findet sich in den Polzellen. Im Stadium 7 wird Schizo im Mesoderm und in der Anlage des anterioren und posterioren Mitteldarms exprimiert. In den späteren Stadien der Embryogenese konnte jedoch keine Expression des Schizo-Proteins im Nervensystem beobachtet werden.

3.5.3 Identifizierung der ARF6-GTPase in *Drosophila*

ARFs gehören zu den Ras-verwandten GTP-bindenden Proteinen, die für den intrazellulären Transport benötigt werden. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten wurde ARF6 der dritten Klasse von ARF-Proteinen zugeordnet (siehe Einleitung). ARF6 reguliert über die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts die Morphologie des Zellkortex (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Radhakrishna and Donaldson, 1997; Song *et al.* 1998) und spielt zudem eine wichtige Rolle in der Regulation der Exocytose und der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose (Bajno *et al.*, 2000; Galas *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Die Identifizierung eines *Drosophila*-Homologs von ARF6 könnte Aufschluß über die Funktionsweise des Gens *schizo* geben. Es wurde daher versucht, mittels Homologiesuche mit der Sequenz von ARF6 aus Ratte (NM024152) ein Homolog in *Drosophila* zu identifizieren. Insgesamt gibt es fünf ARF-GTPasen in *Drosophila*, von denen ARF51F auf dem zweiten Chromosom in der Region 51F liegt und eine 96%ige Homologie zu ARF6 der Ratte zeigt (Abb. 32). Mutationen im Gen ARF51F sind nicht bekannt, aber es existiert ein *EST* cDNA-Klon und eine vitale P-Insertion im ARF51F-Lokus (H. Bellen), die keinen Phänotyp zeigt. Das ARF51F-Transkript ist ubiquitär exprimiert (Daten nicht gezeigt).

3.6 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen dem Gen *schizo* und den GTPasen *Drac1* und *Dcdc42*

Wu *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die aktivierte Form der GTPase Cdc42 an die γ -Untereinheit des Coatomer-Komplexes bindet. Der Coatomer-Komplex ist am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt und sammelt sich an der Golgi-Membran mit Hilfe des GTP-bindenden Proteins ARF an.

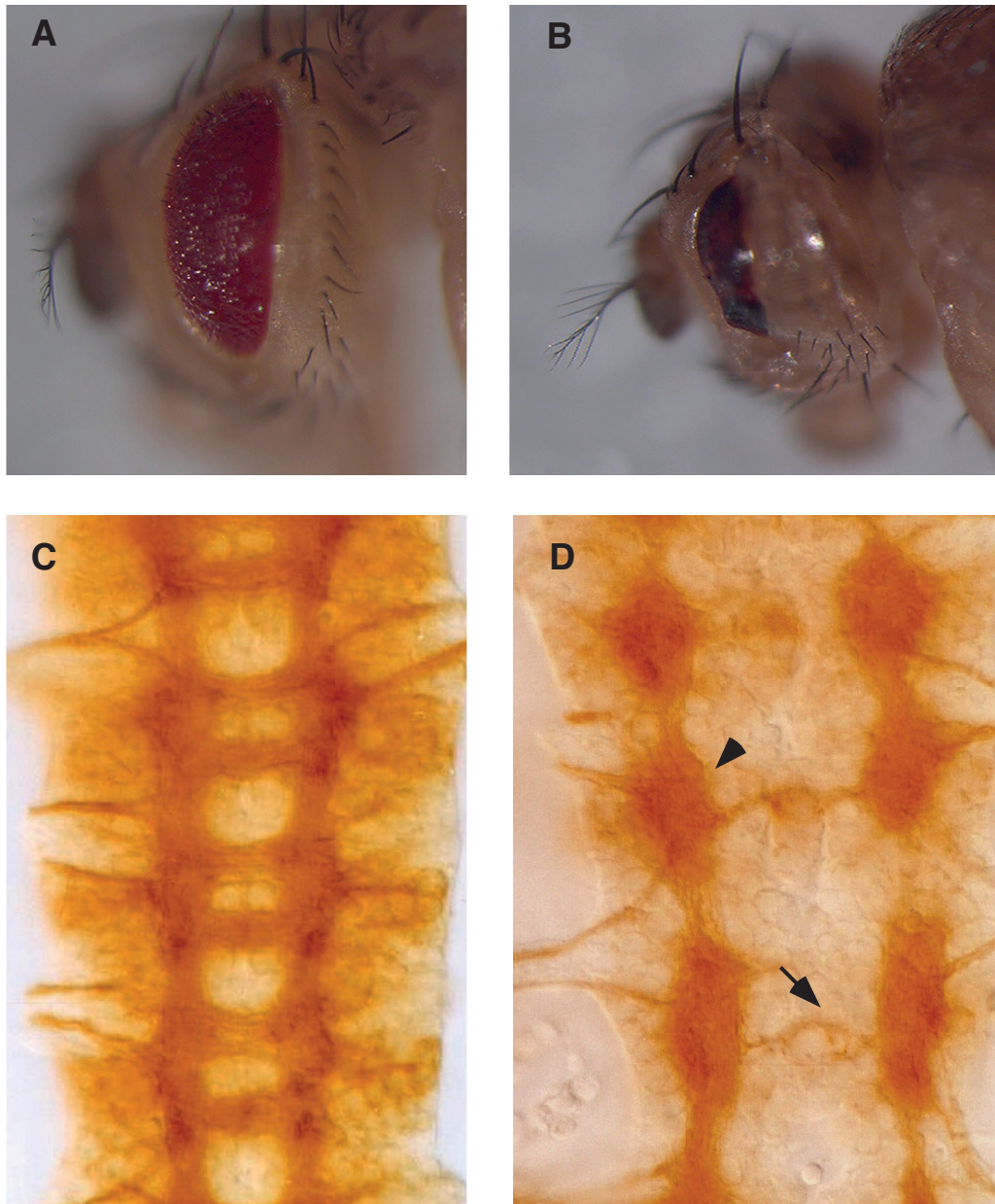


Abb. 33 Genetische Interaktion von *schizo* und *Dcdc42*. (A) und (B) Augen. (C) und (D) ZNS-Präparation von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. (A) Die Überexpression von aktivierten *Dcdc42* mit Hilfe der *GMR-GAL4* Aktivatorlinie führt zu einem verkleinerten, rauhen Auge. (B) Dieser Phänotyp kann durch den Verlust einer Kopie *schizo* verstärkt werden. (C) Wildtyp. (D) In *Dcdc42⁴/schizo^{U112}*-Doppelmutanten kreuzen nur noch wenige Axone die Mittellinie (Pfeil). Zudem sind die longitudinalen Konnektive in den Neuromeren, an denen sich die Kommissuren bilden verdickt (Pfeilspitze).

Die Tatsache, daß ARF-GTPasen zusammen mit Cdc42 an die gleiche Untereinheit im Golgi-Apparat binden, läßt vermuten, daß dies auch bei anderen biologischen Funktionen der Fall ist. Im folgenden war zu analysieren, ob die aktivierte Form von Cdc42 mit dem Gen *schizo* interagieren kann. In einer Reihe von Experimenten wurde zuerst untersucht, ob eine veränderte Aktivität von Cdc42 bei einem Funktionsverlust von *schizo* einen Effekt auf die Bildung des adulten Komplexauges hat. Dazu wurde konstitutiv-aktives Cdc42 mit Hilfe von *GMR*-Gal4 im Auge exprimiert, was zu einer Reduktion des Auges führt (Abb. 33A). Die Entfernung einer Kopie *schizo* führt zu einer Verstärkung des Augen-Phänotyps (Abb. 33B).

Auf Grund dieser Beobachtung wurde analysiert, ob sich im embryonalen ZNS ebenfalls eine Interaktion von Cdc42 und *schizo* nachweisen läßt. Dazu wurde die aktivierte Form von *Dcdc42V12.2* in *schizo*^{C1-028}-Mutanten in den Mittelliniengliazellen (*sim-GAL4* und *slit-GAL4*) überexprimiert. In Hinblick auf die kommissurale Musterbildung führt die Überexpression von aktiviertem Cdc42 im *schizo*-mutanten Hintergrund zu keiner erkennbaren Veränderung. Eine Doppelmutantenanalyse dagegen zeigte einen drastischen Defekt in der axonalen Musterbildung. Für die Doppelmutantenanalyse wurde das *Dcdc42*⁴-Allel verwendet (Fehon *et al.*, 1997). In doppelmutanten *Dcdc4*/*schizo*^{U112}-Embryonen kreuzen kaum noch Axone die Mittellinie und die Konnektive erscheinen verdickt (Abb. 33D). Vergleichbare, aber weniger starke Defekte beobachtet man in doppelmutanten *Dcdc42*⁴/*schizo*^{C1-028}-Embryonen (Abb. nicht gezeigt).

3.7 Überexpression von *schizo* tl

Einen weiteren Beweis dafür, daß die LP01489 cDNA vom Gen *schizo* abgeleitet ist, sollten Rettungsexperimente liefern. Die Expression der LP01489 cDNA in einem *schizo*-mutanten Hintergrund müßte zu einer Abschwächung bzw. Rettung des *schizo*-Phänotyps führen (Abb. 34). Mit Hilfe dieses Experiments kann gleichzeitig geklärt werden, in welchen Zellen Schizo benötigt wird: in den Mittellinienzellen oder den lateralen Neuronen.

Die Expression in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeiten der embryonalen Entwicklung kann mit dem UAS/GAL4-System erzielt werden (Brand & Perrimon, 1993). Dazu wird das zu untersuchende Gen hinter die UAS-Effektor-Sequenz aus der Hefe kloniert und in die Fliege transformiert. Ein weiterer Fliegenstamm enthält den GAL4-Transkriptionsfaktor, der mit Hilfe geeigneter Promotoren zell- und gewebespezifisch reguliert exprimiert werden kann. Nur wenn man die den Aktivator tragenden Fliegen mit Tieren kreuzt, die den Effektor tragen, kommt es in den Nachkommen zu einer zeitlich und räumlich definierten Expression des betreffenden Gens.

3.7.1 Überexpression der LP01489 cDNA in *schizo*-mutanten Embryonen

Das 4,5 kb große EcoRI-Fragment der LP1489 cDNA, das den gesamten ORF enthält, wurde in den pUAST-Expressionsvektor kloniert und anschließend zusammen mit der $\Delta 2-3$ Transposase in *white*⁻-Embryonen injiziert (siehe M&M). Von 320 injizierten Embryonen wurde eine Linie erhalten, die homozygot ein UAS-*schizo*-Transgen auf dem 3. und ein UAS-*schizo*-Transgen heterozygot auf dem 2. Chromosom trägt.

Injizierte Embryonen	Geschlüpfte Larven	Geschlüpfte Fliegen	Transgene (F1)
320 (100%)	60 (19%)	35 (11%)	1 (0,3%)

Tabelle 6: Etablierung von P[UAS-*schizo*]-Insertionen

Um *schizo* im *schizo*-mutanten Hintergrund überzuexprimieren, wurde eine Rekombinante mit dem *schizo*^{U112}-Allel und der UAS-*schizo*-Insertion hergestellt, die dann mit unterschiedlichen Effektorlinien in verschiedenen neuronalen Zellen zur Expression gebracht wurde.

Für die Expression von UAS-*schizo*; *schizo*^{U112} in den Zellen der Mittellinie wurden Rekombinanten mit dem *schizo*^{C1-028}-Allel und den Effektorlinien *sim-GAL4* (3. Chromosom) und *slit-GAL4* (3.Chromosom) hergestellt (siehe M&M). *sim-GAL4* wird ab dem Stadium 11 in allen Zellen der Mittellinie exprimiert und *slit-GAL4* in den Mittelliniengliazellen und

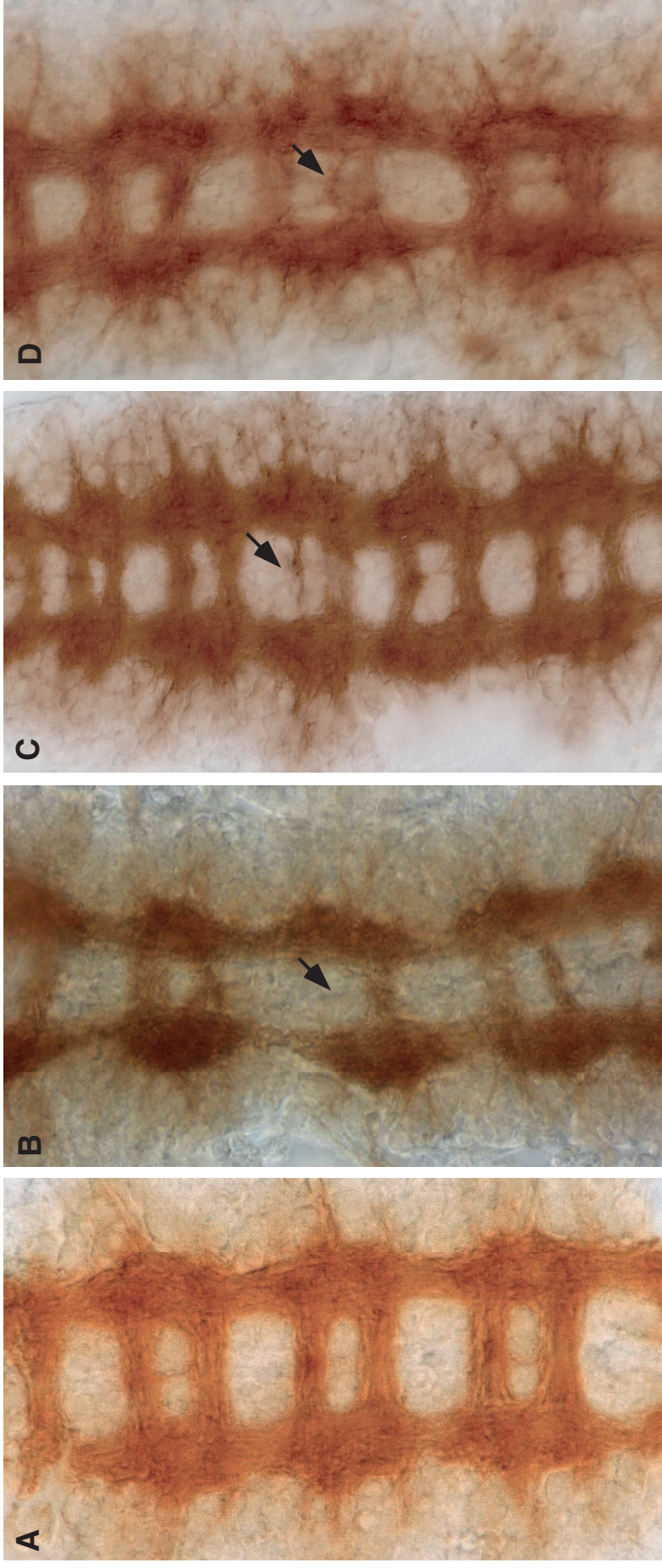


Abb. 34 Rettungsexperiment. Detailaufnahme von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben. (A) Wildtyp, (B) die *schizo^{UIZ}*-Mutante, (C) und (D) zeigen die Überexpression des *schizo t1*-Transkripts in den Zellen der ZNS-Mittellinie (*slit-GAL4*) im *schizo*-mutanten Hintergrund. In (B) sieht man deutlich, daß die anteriore Kommissur wieder gebildet wird (Pfeilspitze). In einigen Neuromeren beobachtet man allerdings auch ein unregelmäßiges Kreuzen der kommissuralen Axone (D, Pfeil).

einigen Neuronen der lateralen Mittellinie. Mit beiden *GAL4*-Treiberlinien ist eine Rettung des embryonalen ZNS-Phänotyps möglich (Abb. 34B und C).

Eine Überexpression von UAS-*schizo* in den neuronalen Zellen des ZNS wurde mit den Effektorlinien *rho-GAL4* (2. Chromosom) und *sca-GAL4* (2. Chromosom) erzielt. Mit beiden *GAL4*-Linien konnte keine Rettung des *schizo*-Phänotyps beobachtet werden.

Die Tatsache, daß sich der ZNS-Phänotyp von *schizo*-Mutanten durch die Überexpression der LP01489 cDNA „retten“ läßt, zeigt, daß die LP01489 cDNA vom Gen *schizo* abgeleitet ist. Da sich homozygot mutante *schizo*-Embryonen durch eine Überexpression von *schizo* in den Zellen der Mittellinie retten lassen, wird vermutet, daß Schizo in diesen Zellen benötigt wird. Ein Rettungsversuch mit der RE44556 cDNA war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

3.7.2 Ektopische Expression des *schizo*-Gens

3.7.2.1 Überexpression von UAS-*schizo* im ZNS

In den folgenden Experimenten wurde die Überexpression von UAS-*schizo* in verschiedenen neuronalen Geweben im wildtypischen Hintergrund untersucht. Die Treiberlinien *sim-*, *rho-*, *slit-*, *sim-*, *da-*, und *arm-GAL4* führten nach Kreuzung gegen UAS-*schizo* weder zu einem ZNS-Phänotyp noch zur embryonalen Letalität. Nach Expression des UAS-*schizo*-Transgens im *scabrous*-Muster beobachtet man eine reduzierte Anzahl von Macrochaeten (Abb. 35C und D) und einen schwachen rauhen Augen-Phänotyp (Abb. nicht gezeigt).

3.7.2.2 Überexpression von UAS-*schizo* in den dorsozentralen mechanosensorischen Organen

Auf dem Thorax adulter *Drosophila*-Fliegen gibt es zwei Typen von sensorischen Organen, die Macrochaeten und die Microchaeten. Wie zuvor unter 3.5.3.1 erwähnt, führt die

ektopische Expression der *schizo*-cDNA mit Hilfe des *sca-GAL4*-Treibers zu einer reduzierten Zahl der Macrochaeten auf dem Notum. Die noch vorhandenen Macrochaeten erscheinen verdickt und verkürzt (Abb. 35B). Auch die Borsten auf dem Abdomen scheinen verdickt zu sein (Abb. 35E). Es sieht weiterhin so aus, als wäre der dorsale Schluß des Abdomens nicht vollständig, und die Borsten auf dem Abdomen weisen in eine andere Richtung als im Wildtyp (Abb. 35E, Pfeil). Eine weitere *GAL4*-Linie, die auch in Macrochaeten exprimiert ist, ist *dpp-GAL4*. Bei der Überexpression von UAS-*schizo* mit dieser Linie kommt es ebenfalls zum Fehlen von Macrochaeten auf dem Notum (Abb. 35C und D). Eine Verdickung der Borsten, wie sie nach einer Überexpression von *sca-Gal4* auftritt, kann jedoch nicht beobachtet werden.

Die Bildung der Macrochaeten wird von den Epithelschichten des Notums der Flügelscheibe während des 3. Larvalstadiums etabliert und reicht bis ins frühe Puppenstadium (Hartenstein & Posakony, 1989; Huang *et al.*, 1991). In dieser Region ist die *schizo* LP01489-cDNA exprimiert (siehe 3.4.2).

3.7.2.3 Überexpression von UAS-*schizo* im Auge

Für die Überexpression von *schizo* im Auge wurden vier verschiedene Treiberlinien benutzt. *GMR-GAL4* erlaubt die Expression in allen Zellen hinter der morphogenetischen Furche, *elav-GAL4* wird in allen Photorezeptoren und *ey-GAL4* in allen Zellen der Augenanlage exprimiert. Die -Linie *K25* zeigt eine *GAL4*-Expression im *sevenless*-Muster, d.h in den Photorezeptorzellen R7, R1, R3, R4 und R6 , sowie den Kegelzellen.

Wie schon unter 3.5.3.1 erwähnt, führt eine Überexpression der *schizo*-cDNA mit *sca-GAL4* bei 25°C zu einem schwachen rauhen Augen-Phänotyp. Auch die ektopische Expression von *schizo* mit *elav-GAL4* bei 25°C resultiert in einem schwachen rauhen Augen-Phänotyp (Abb. nicht gezeigt). Stärkere Aktivatorlinien wie *GMR-GAL4* und *ey-GAL4* verursachen bei 25°C einen starken rauhen Augen-Phänotyp (Abb. 36A, B und C). Von *ey-Gal4* existieren mehrere verschieden stark exprimierte Aktivatorlinien (Abb. 36A und B). Die stärkste *ey-GAL4*-Linie führt zu einer starken Reduktion des Auges (Abb. 36B). Die Überexpression von *schizo* mit

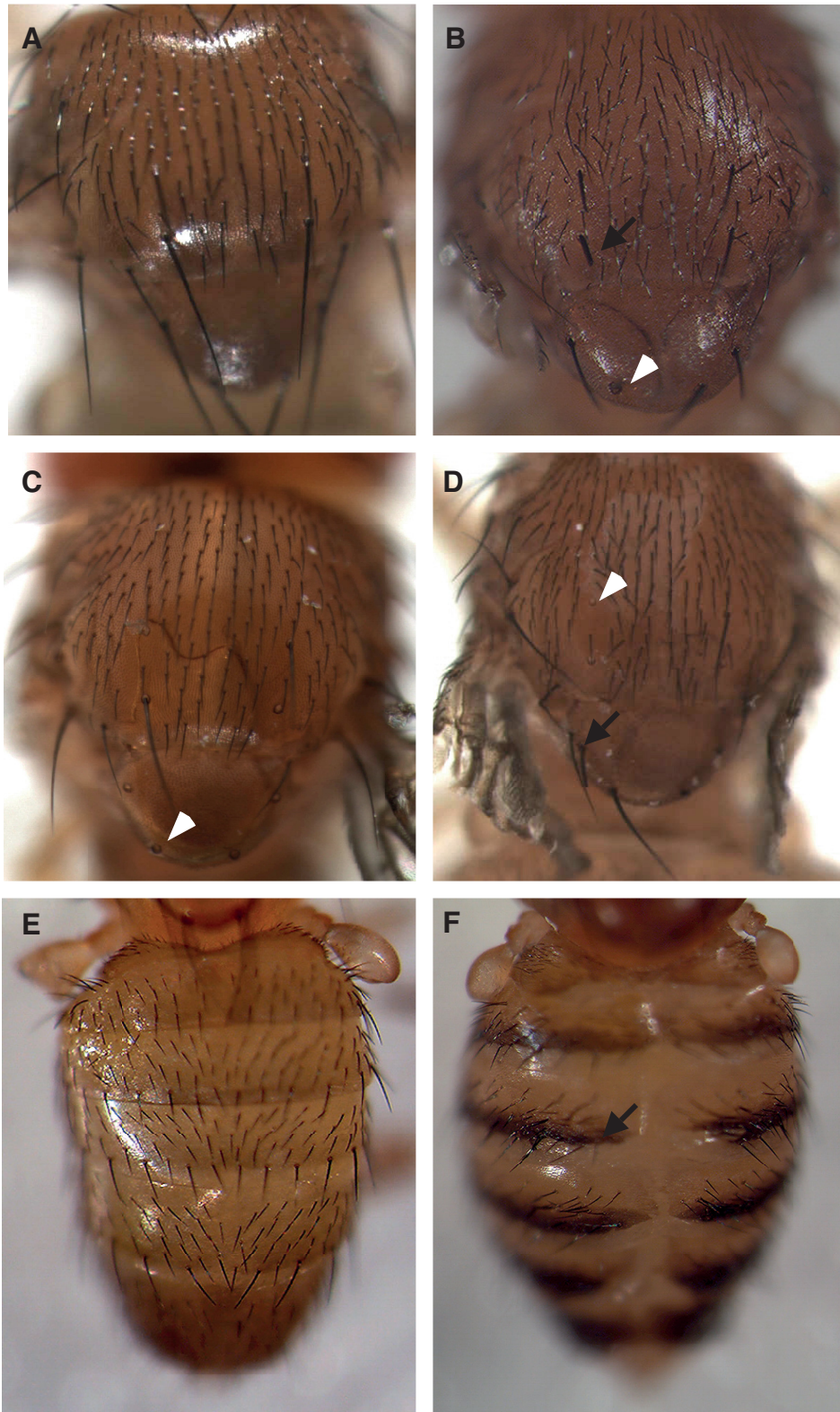


Abb. 35 Die Überexpression von *schizo* führt zu Defekten auf dem Notum und dem Abdomen. Expression von UAS-*schizo* mit den Aktivatorlinien *sca-GAL4*- und *dpp-GAL4*. (A)-(D) Notum, (E)-(D) Abdomen. (A) Wildtyp. (B) In heterozygoten UAS *schizo*; *sca-GAL4*-Tieren fehlen Macrochaeten auf dem Notum (Pfeilspitze) und die noch vorhandenen erscheinen verdickt bzw. verkürzt (Pfeil). (C) und (D) Die Überexpression von UAS-*schizo* mit *dpp-GAL4* führt zu einer Reduktion der Macrochaeten. (E) Abdomen, Wildtyp. (F) Die ektopische Expression von UAS-*schizo* mit *sca-GAL4* induziert auch abdominale Defekte. Der dorsale Schluß scheint nicht richtig vollzogen zu sein und die Borsten weisen im Vergleich zum Wildtyp weg von der Mitte (Pfeil).

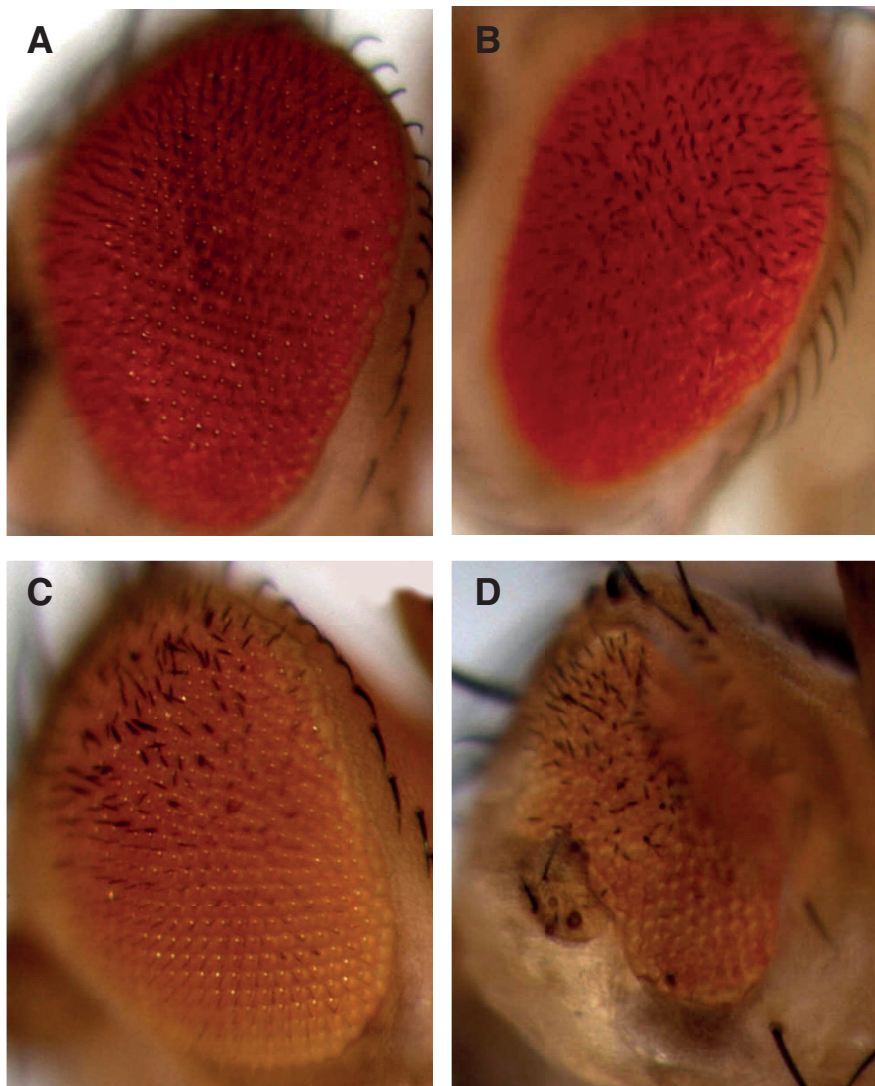


Abb. 36 Überexpression von UAS-*schizo* im Auge. Anterior ist oben. (A) Die ektopische Expression von UAS-*schizo* im Auge mit *K25-GAL4* bei 25°C sieht wildtypisch aus. (B) Die Überexpression von *schizo* mit *GMR-GAL4* führt zu einem rauhen Augen-Phänotyp. (C) und (D) zeigen die ektopische Expression von UAS-*schizo* mit zwei unterschiedlich starken *ey-GAL4* Aktivatorlinien. In (C) ist vorwiegend der anteriore Teil des Auges ungeordnet. Das Auge in (D) ist dagegen stark reduziert.

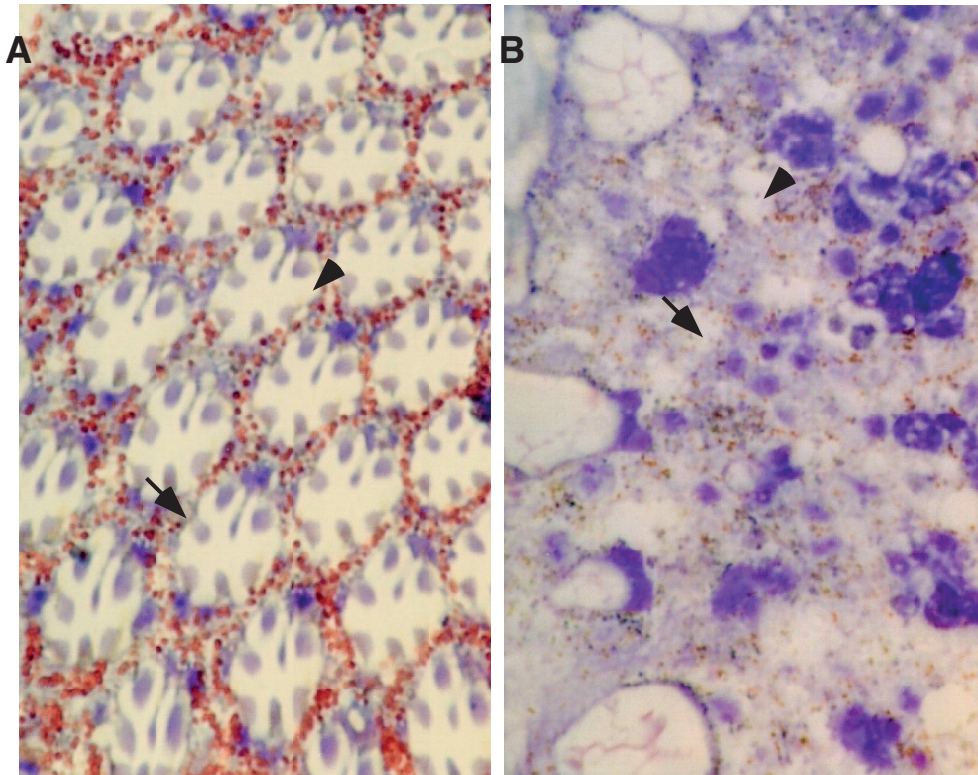


Abb. 37 Querschnitt durch das Komplexauge von homozygoten *GMR-GAL4; UAS-schizo* Augen. (A) Im Wildtyp-Auge erkennt man eine bienenwabenähnliche Anordnung der Ommatidien, in dem sieben Rhabdomere zu erkennen sind (Pfeil). Umgeben sind die Ommatidien von Pigmentzellen, in denen sich die Pigmentgranula befinden (Pfeilspitze). (B) In homozygoten *GMR-GAL4; UAS-schizo* Augen sind die Ommatidien nicht mehr regelmäßig angeordnet und scheinen in ihrer Anzahl reduziert zu sein. In den vorhandenen Ommatidien befinden sich meist auch weniger als sieben Rhabdomere (Pfeil). Die Pigmentgranula sind unregelmäßig über das Auge verteilt (Pfeilspitze).

der *K25-GAL4* bei 25°C sieht wildtypisch aus (Abb. 36D). Die Aufzucht der Fliegen bei 29°C hat jedoch einen rauhen Augen-Phänotyp zur Folge.

Von den Augen homozygoter *GMR-GAL4; UAS-schizo* Tieren wurden Semidünnschnitte angefertigt (Abb. 37). Ein adultes Komplexauge besteht aus 750-800 Ommatidien und enthält acht photosensitive Neurone, die regelmäßig in hexagonalen Einheiten angeordnet sind. Optisch werden die Ommatidien von den Pigmentzellen isoliert (Abb. 37A, Pfeil). In den adulten Augen homozygoter *GMR-GAL4; UAS-schizo* Tiere ist die Anzahl der Ommatidien und der Photorezeptorzellen reduziert. Die einzelnen Ommatidien werden auch nicht mehr von den Pigmentzellen abgegrenzt, sondern die Pigmentgranula scheinen über das Auge verstreut zu sein.

Das adulte Auge wird während des larvalen Stadiums angelegt. Um zu analysieren, ob die beobachteten Augendefekte auf frühe Störungen in der Entwicklung des Auges zurückzuführen sind, wurden Augenimaginalscheiben aus L3-Larven präpariert und mit den monoklonalen Antikörpern mAb Elav und 22C10 angefärbt. Die sich entwickelnden Ommatidien erscheinen im Vergleich zum Wildtyp weitgehend normal. Allerdings befinden sich Elav-positive Zellen im optischen Stiel, der normalerweise frei von Photorezeptorzellen ist (Abb. 38A und B). Dieser Effekt wird auch bei einer Überexpression der *schizo*-cDNA bei 25°C und 29°C mit *ey-GAL4* beobachtet (Abb. 38C und D). Bei der Überexpression von *UAS-schizo* mit der Aktivatorlinie *K25-GAL4* bei 25°C kommt es nicht zur Migration von Photorezeptorzellen; bei 29°C beobachtet man aber auch hier Photorezeptorzellen im optischen Stiel (Abb. nicht gezeigt).

Die Expression des 22C10-Epitops in der sich entwickelnden Augenimaginalscheibe beginnt direkt posterior zur morphogenetischen Furche (MF). Nach der axonalen Projektion ist das 22C10-Epitop sowohl im neuronalen Zellkörper als auch über die gesamte Länge des Axons verteilt. Zudem erkennt man das Axonbündel des Bolwig-Organ in der Augen-Antennen-Imaginalscheibe (Abb. 39A, Pfeil). Die Überexpression von *UAS-schizo* mit der Aktivatorlinie *ey-GAL4* hat keinen Effekt auf den Bolwig-Nerv (Abb. 39B, Pfeil). Auch in der

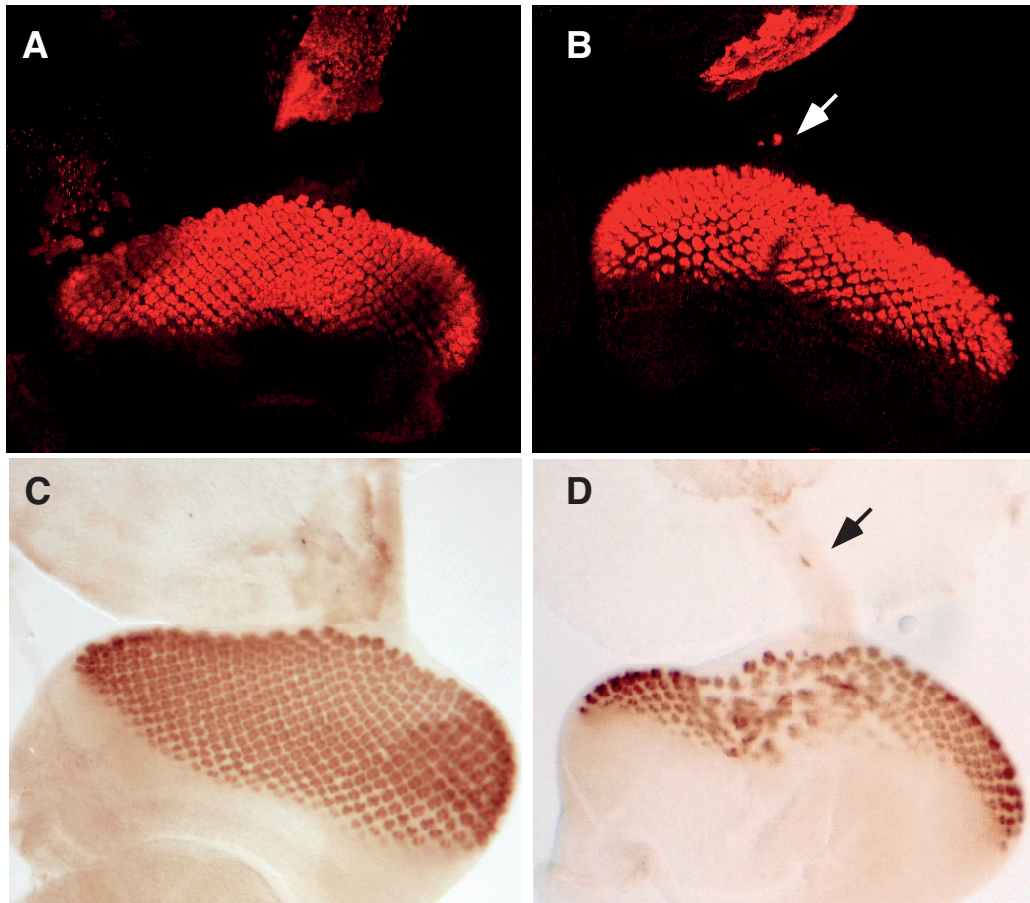


Abb. 38 Die Überexpression von *schizo* in der Augenimaginalscheibe. Präparation von Augen-Antennen-Imaginalscheiben des 3. Larvalstadiums. Posterior ist oben. Die Scheiben sind noch mit dem optischen Loben durch den optischen Stiel verbunden. Postmitotische Neurone wurden durch eine anti-Elav Färbung sichtbar gemacht. (A) und (B) sind konfokale Antikörperfärbungen, (C) und (D) sind Antikörperfärbungen mit anschließender HRP-Immunhistologie. Der mAb anti-Elav markiert differenzierte Photorezeptorzellen. (A), (C) Im Wildtyp erkennt man die regelmäßige Anordnung der Ommatidien in der Augen-imaginalscheibe. (B) zeigt die homozygote *GMR-GAL4; UAS-schizo* Imaginal-scheiben. Die Anordnung der Ommatidien erscheint wildtypisch, aber es befinden sich anti-Elav positive Zellen im optischen Stiel. (D) zeigt die ektopische Expression von *UAS-schizo* mit der Aktivatorlinie *ey-GAL4*. Die Imaginalscheibe weist morphologische Defekte auf und die Anordnung der Ommatidien ist gestört. Auch bei der Überexpression mit *ey-GAL4* befinden sich Elav-positive Zellen im optischen Stiel (Pfeil).

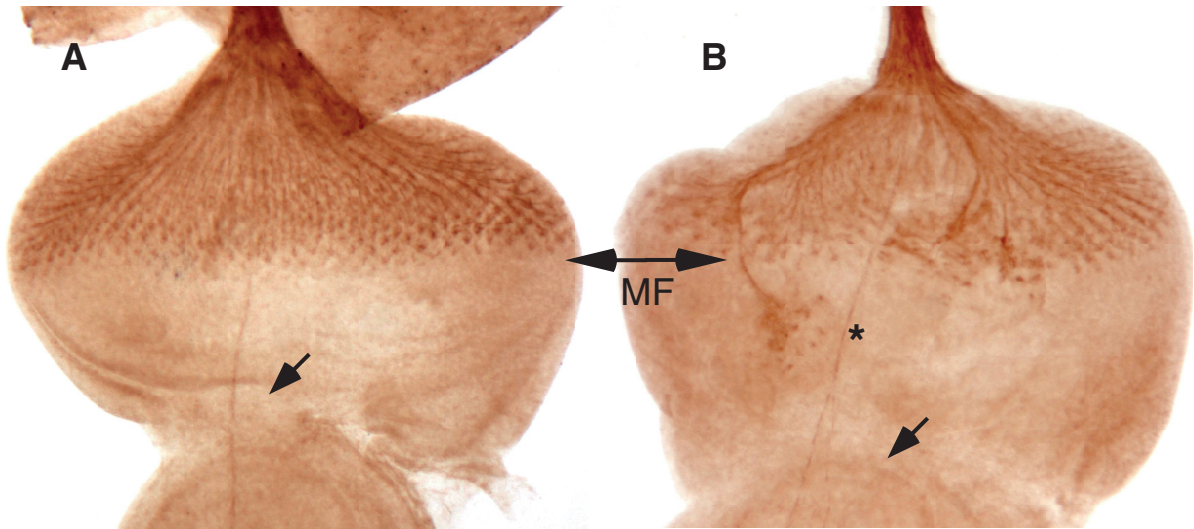


Abb. 39 Die Überexpression von *schizo* in der Augenimaginalscheibe. Präparation von Augen-Antennen-Imaginascheiben des 3. Larvalstadiums nach Antikörperfärbung mit mAb 22C10 und folgender HRP-Immunhistochemie. Posterior ist oben. Der mAb 22C10 markiert differenzierte Neurone und axonale Fortsätze der Photorezeptoren. Zusätzlich markiert er den Bolwig-Nerv. (A) zeigt den Wildtyp. Man erkennt eine regelmäßige Anordnung der Ommatidien sowie die Projektion der Axone durch den optischen Stiel in den optischen Loben. Der Bolwig-Nerv zieht sich entlang der anterior-posterioren Achse über die Augen-Antennen-Imaginalscheibe (Pfeil). (B) Die Ommatidien sind unregelmäßig angeordnet. Eine Gruppe von Photorezeptorzellen liegt vor der morphogenetischen Furche (MF) (siehe *). Dieser Phänotyp ist allerdings sehr variabel in seiner Ausprägung.

axonalen Projektion treten keine Defekte auf. Allerdings ist die Grenze der MF nicht mehr exakt definiert. Dieser Effekt wurde auch schon in anti-Elav gefärbten UAS-*schizo/ey-GAL4*-Scheiben beobachtet (siehe Abb. 39D). In *Drosophila* beginnt die Zelldifferenzierung im Auge mit der Induktion der MF. Alle Zellen vor der MF befinden sich in einem undifferenzierten Zustand, hinter der MF jedoch findet man Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Die Expression von *schizo* führt in 10% der Imaginalscheiben zu einer ektopischen Differenzierung von Photorezeptorzellen, die sich vor der MF befinden (Abb. 39B).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die durch die ektopische *schizo*-Expression induzierten adulten Augen-Phänotypen nicht während der Entwicklung der Augenimaginalscheibe entstehen, sondern vermutlich zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung. Die Überexpression von *schizo* kann eine ektopische Zellmigration induzieren. Ein homozygoter *GMR-GAL4; UAS-schizo* Stamm wurde etabliert, um nach Modifikatoren des Augen-Phänotyps zu suchen. Das Einkreuzen einer Mutation, die im *schizo*-Signalweg wirkt, sollte entweder zu einer Abschwächung oder zu einer Verstärkung des durch ektopische Expression von *schizo* induzierten Phänotyps führen.

3.7.2.4 Versuch der Abschwächung des Augen-Phänotyps durch Herausnahme einer

Kopie *schizo*

Ein weiter Beweis dafür, daß es sich bei der LP01489 cDNA um das Gen *schizo* handelt, das den Überexpressionsphänotyp im Auge verursacht, ist die Abschwächung des rauhen Augen-Phänotyps durch das Einkreuzen eines *schizo*-defizienten Chromosoms. Die beiden EMS-Allele wurden ausgekreuzt gegen den homozygoten *GMR-GAL4; UAS-schizo* Stamm und mit Kontrolltieren verglichen, die gegen Wildtyp ausgekreuzt wurden. Es konnte weder eine Abschwächung des rauhen Augen-Phänotyps mit dem *schizo*^{U112}-Allel noch mit dem *schizo*^{Cl-028} Allel beobachtet werden. Auch die *schizo* EMS-Allele komplementierenden Defizienzen

Df(3L)ME14 und *Df(3L)ME178* vermochten es nicht, den Überexpressionsphänotyp abzuschwächen.

3.7.2.5 Überexpression der *schizo* cDNA im Mitteldarm

Homozygot mutante *schizo*-Embryonen zeigen wie unter 3.1.7 beschrieben einen Phänotyp im visceralen Mesoderm. Mit Hilfe einer *GAL4*-Aktivatorlinie (P0199, Flyview), die spezifisch im Mitteldarm und in den visceralen Muskeln exprimiert wird, wurde *schizo* hier ektopisch exprimiert. Die Nachkommen aus diesem Experiment waren lebensfähig, und eine FasIII-Färbung an den aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Embryonen zeigte keine Defekte. Eine Rettung des Darm-Phänotyps mutanter *schizo*-Embryonen war nicht möglich.

3.8 Sequenzierung der *schizo* EMS-Mutanten

Die Rettungsexperimente haben gezeigt, daß das Gen *schizo* ein ARF6 GEF kodiert. Man sollte daher erwarten, daß in den EMS-induzierten *schizo*-Mutationen Punktmutationen in der kodierenden Sequenz vorliegen. Mittels spezifischer Primer (siehe Anhang V) wurden die kodierenden DNA-Bereiche aus homozygot mutanten *schizo*-Embryonen amplifiziert und anschließend sequenziert. Es konnten jedoch keine Punktmutationen in diesen Bereich nachgewiesen werden. Auch für das *schizo t2*-Transkript konnte kein Nucleotid-Austausch nachgewiesen werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Mutationen in den EMS-Allelen den Promotorbereich betreffen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die molekulare Charakterisierung des Gens *schizo*, einem neu identifizierten Gen, dem eine wesentliche Bedeutung in der kommissuralen Musterbildung zukommt. Weiterhin sollte eine funktionelle Analyse dieses Gens erfolgen. Einige Faktoren, die bei der Bildung der Kommissuren beteiligt sind, sind bereits in der Literatur beschrieben (siehe Einleitung). Zu diesen gehören Netrin und Slit, die eine attraktive bzw. repulsive Wirkung auf die kommissuralen Wachstumskegel ausüben. Die Frage, die sich nach der Identifizierung des Gens *schizo* stellte, war, ob es sich bei dem Schizo-Genprodukt um eine Komponente der schon bekannten Signalwege Netrin und Slit handelt oder ob *schizo* in einem neuen, noch unbekanntem Signalweg wirkt. In den folgenden Abschnitten wird die phänotypische, genetische und molekulare Analyse von *schizo* diskutiert.

4.1 Die phänotypische Analyse des Gens *schizo*

4.1.1 Der neuronale Phänotyp *schizo*-mutanter Embryonen

Die phänotypische Analyse des ZNS von homozygot mutanten *schizo*-Embryonen deckte Defekte in den segmentalen Kommissuren auf, insbesondere bei der Bildung der anterioren Kommissur (Abb. 4). Die Reduktion der Kommissuren in dem *schizo*^{C1-028}-Allel ist vorwiegend auf die thorakalen Segmente beschränkt, wohingegen im *schizo*^{U112}-Allel auch abdominale Segmente betroffen sein können. An der kommissuralen Musterbildung sind zwei unterschiedliche Signalwege beteiligt, die von den Signalproteinen Netrin und Slit initiiert werden. *schizo*-mutante Embryonen zeigen eine auffallende Ähnlichkeit zu *netrin*-Mutanten, in denen man ebenfalls einen „reduzierten Kommissuren“-Phänotyp beobachtet. *schizo* könnte daher im Netrin-Signalweg involviert sein oder ein Mitglied eines neuen, attraktiven Signalwegs sein, der parallel zu Netrin wirkt.

Hinweise für die Existenz neuer Faktoren bei der attraktiven Wachstumsregulation von Axonen stammen aus einer Studie, in der die Rolle von Netrin und seinem Rezeptor Frazzled

bei der Projektion retinaler Neurone untersucht wurde. In dieser Arbeit wurde ein weiterer, bislang unidentifizierter Netrin-Rezeptor vorgeschlagen, der zusammen mit Frazzled attraktiv auf die retinalen Axone wirkt (Gong *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Doppelmutantenanalyse hat nahegelegt, daß *schizo* keine Komponente des Netrin-Signalwegs kodiert (siehe 3.1.3.1, Abb. 7). Desweiteren weisen die Expressionsdaten der *netrin-A*-RNA in *schizo*-defizienten Embryonen daraufhin, daß *schizo* nicht an der Aktivierung von *netrin* beteiligt ist. Die Rettung des kommissuralen Phänotyps durch die Überexpression von *netrin B* in den Zellen der Mittellinie legt jedoch eine Interaktion des Netrin-Signalwegs mit *schizo* nahe.

Neben der Funktion von *schizo* als Komponente des Netrin-Signalweges, ist es möglich, daß *schizo* in einem neuen Netrin-unabhängigen Signalweg involviert ist. Hinweise für die Existenz von bislang unidentifizierten Signalwegen kommen aus verschiedenen Modellorganismen. Die unvollständige Reduktion der Kommissuren in den Mutationen von *netrin* und *frazzled* in *Drosophila* (Harris *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1996; Kolodziej *et al.*, 1996) oder von *netrin-1* und *DCC* im Nervensystem der Maus (Serfani *et al.*, 1996, Fazeli *et al.*, 1997) lassen vermuten, daß es neben dem Netrin-Signalweg noch einen weiteren unabhängigen Signalweg gibt, der die Attraktion kommissuraler Wachstumskegel vermittelt. In *C.elegans* wurde in einem Suppressor-Screen nach Genen gesucht, die wie das *netrin*-Homolog UNC-6 an der axonalen Wegfindung beteiligt sind (Colavita & Culotti, 1998). Ein Kandidat, der in diesem Screen identifiziert wurde, ist UNC-129, das für einen neuen Liganden der Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Rezeptorfamilie kodiert (Colavita *et al.*, 1998; Krishna *et al.*, 1999).

Neben einer Funktion im Netrin-Signaltransduktionsweg wäre *schizo* auch als Komponente des repulsiven Slit-Signalwegs denkbar. Daß die Expression von Slit in der Tat reguliert werden kann, wurde von Crowner *et al.* (2002) gezeigt, die in Mutanten des Gens *longitudinals lacking* (*lola*) eine Reduktion der Slit-Expression beobachtet haben. Es wurde daher

untersucht, ob auch *schizo* an der Regulation von *slit* beteiligt ist. In *schizo*-mutanten Embryonen ist die Expression von Slit allerdings verstärkt. In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, daß der mutante *schizo*-Phänotyp durch eine geringe Reduktion der Slit-Gendosis partiell gerettet werden kann. Dazu wurde hier ein hypomorphes *slit*-Allel verwendet, das einen *robo*-ähnlichen Phänotyp zeigt (Battye *et al.*, 2001). In *schizo*-mutanten Embryonen sieht es ferner so aus, als ob sich Slit nicht mehr ausschließlich an der Zellmembran befindet, sondern auch cytoplasmatisch exprimiert wird (Abb. 10F).

Die Expression des Slit-Proteins und die genetische Analyse haben gezeigt, daß Schizo an der Regulation von *slit* beteiligt ist, sei es auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene. Dies könnte auch erklären, warum sich der *schizo*-mutante Phänotyp durch die Überexpression von *netrin* in den Zellen der Mittellinie retten läßt. Eine Erhöhung des attraktiven Signals in *schizo*-mutanten Embryonen kann die höhere Dosis des Slit-Signals kompensieren, wodurch die anteriore Kommissur wieder gebildet werden kann.

Schizo ist aber nicht nur an der Regulation von *slit* beteiligt, sondern interagiert auch mit dem Slit-Rezeptor *robo* (siehe 3.1.3.5). Eine Reduktion der *robo*-Dosis führt ebenfalls zu einer Abschwächung des *schizo*-mutanten Phänotyps (Abb. 12). Doch Schizo muß nicht unbedingt direkt an der Regulation von Robo beteiligt sein. Die beobachteten Defekte in *robo*-Mutanten können durch eine 50%ige Reduktion von Slit noch verstärkt werden (Kidd *et al.*, 1999; Battye *et al.*, 1999). In *schizo*-mutanten Embryonen ist die Expression von *slit* erhöht, was sich auch auf die Aktivität des Rezeptors Robo auswirken könnte.

Es existieren drei Robo-Rezeptoren in *Drosophila*, die in unterschiedlicher Kombination zusammen exprimiert werden und die medial-laterale Position der longitudinalen Axontrakte determinieren (Rajagopalan *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000a; Simpson *et al.*, 2000b). *robo2*- und *robo3*-mutante Embryonen sehen in der mAb BP102 Färbung wildtypisch aus. Nur für *robo2* konnte auch eine Funktion in der kommissuralen Musterbildung nachgewiesen werden (Simpson *et al.*, 2000b; Schimmelpfeng *et al.*, 2001). *robo/robo2* Doppelmutanten

führen zu einem *slit*-ähnlichen Phänotyp. Es gibt allerdings qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren. Homozygot mutante *robo2*-Embryonen zeigen in den FasII-positiven longitudinalen Faszikeln unter anderem Defekte im lateralen Faszikel. Auch in *schizo*-Mutanten ist das äußere longitudinale Faszikel reduziert. Es wäre daher interessant zu analysieren, ob sich eine Interaktion von *robo2* und *schizo* nachweisen läßt.

Eine Analyse der Mittelliniengliazellen, die die Signalmoleküle Netrin und Slit exprimieren, deckte in *schizo*-mutanten Embryonen gliale Defekte in der Mittellinie auf. In *schizo*-mutanten Embryonen migrieren die Mittelliniengliazellen weiter nach anterior als in wildtypischen Embryonen. Es ist jedoch zu vermuten, daß der beobachtete Phänotyp ein sekundärer Effekt ist, da sich die migrierenden Mittelliniengliazellen an den Kommissuren orientieren. Die Mittelliniengliazellen sind nicht nur wichtig für die Trennung der Kommissuren, sondern der Kontakt zwischen Gliazellen und Axonen ist auch wichtig für das Überleben beider Zelltypen (Booth et al., 2000; Hidalgo & Booth, 2000). Für das Überleben der Mittelliniengliazellen ist das zur Ig Superfamilie gehörende Protein Wrapper verantwortlich, da es die Apoptosis in den Gliazellen der Mittellinie unterdrückt (Noordermeer et al., 1998; Jacobs, 2000). In *wrapper*-Mutanten sterben die Gliazellen, und die Kommissuren werden nicht mehr richtig getrennt (Noordermeer et al., 1998). In *schizo*-mutanten Embryonen jedoch ist die Anzahl der Mittelliniengliazellen nicht reduziert. Welche Faktoren an den Migrationsprozessen bei der Trennung der Kommissuren beteiligt sind, ist noch unbekannt. Die Tatsache, daß die Mittelliniengliazellen in *schizo*-Mutanten zu weit migrieren, läßt vermuten, daß von den kommissuralen Axonen ein Signal ausgeht, das den Migrationsvorgang beendet.

4.1.2 Beteiligung von *schizo* am Auswachsen der peripheren Neurone und der

Migration der peripheren Gliazellen

Außer dem beobachteten ZNS-Phänotyp zeigen *schizo*-mutante Embryonen auch Defekte im peripheren Nervensystem (PNS). Die Muskeln in den abdominalen Segmenten werden von den Motoneuronen des PNS innerviert. Dabei unterscheidet man zwei Nervenbündel in jedem abdominalen Hemisegment, den segmentalen (SN) und den intersegmentalen Nerven (ISN) (Thomas *et al.*, 1984; Jacobs & Goodman, 1989b). Von diesen Nerven gehen sekundäre Verzweigungen aus, die dann die Muskeln innervieren. In *schizo*-mutanen Embryonen kommt es zu Defekten im Auswachsen der motorischen Neurone (Abb. 12).

Neurone und Gliazellen liegen im Nervensystem in unmittelbarer Nachbarschaft, und Defekte des axonalen Wachstums können durch Fehlfunktionen von Neuronen oder Gliazellen hervorgerufen werden. So ist zum Beispiel der Kontakt zwischen den beiden Zelltypen essentiell für das Überleben von Axonen und Gliazellen. In Vertebraten schütten Gliazellen neurotrophe Faktoren aus, die das Überleben der Neurone im ausgewachsenen PNS gewährleisten. Die Eliminierung der Gliazellen führt zu einer Degeneration der Motoneurone (Masu *et al.*, 1993; Riethmacher *et al.*, 1997). Werden die lateralen Gliazellen im ZNS von *Drosophila* genetisch entfernt, dann leiten die Neurone Apoptose ein (Booth *et al.*, 2000). Die Gliazellen des zentralen Nervensystems sind zudem an der axonalen Wegfindung beteiligt (Hidalgo & Booth, 2000).

Aus diesem Grunde wurden die *schizo*-mutanten Embryonen auf Anomalitäten verschiedener glialer Zelltypen untersucht. Für die lateralen Gliazellen konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der peripheren Gliazellen in *schizo*-mutanten Embryonen zeigte Abweichungen zum wildtypischen Embryo.

Im Wildtyp werden die peripheren Gliazellen am lateralen Rand des ZNS geboren und wandern von dort aus in die Peripherie des Embryos. Die Entwicklung der peripheren Gliazellen wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren kontrolliert: *Krüppel*, *glia cell missing* und *pointed* (Romani *et al.*, 1996; Hosoya *et al.*, 1995; Klaes *et al.*, 1994). Sie dienen

als intermediäre Ziele für auswachsende Neuriten, die das ZNS verlassen und in das periphere Nervensystem eintreten. Die peripheren Gliazellen werden dabei sowohl von Motoneuronen als auch von sensorischen Neuronen kontaktiert (Sepp *et al.*, 2000). Zunächst wachsen die Pionierneurone aus und passieren die Grenze zwischen dem ZNS und dem PNS. Die peripheren Gliazellen migrieren entlang dieser axonalen Wege in das PNS und bündeln die Axone (Sepp *et al.*, 2000). Wenn die peripheren Gliazellen anfangen zu migrieren, dienen sie als Substrat für die sensorischen Axone (Sepp *et al.*, 2000; Sepp *et al.*, 2001). Nach Beendigung der peripheren Gliamigration haben sich die Gliazellen in regelmäßigen Abständen entlang der segmentalen und intersegmentalen Nerven verteilt.

In *schizo*-mutanten Embryonen ist der Abstand zwischen den peripheren Gliazellen verringert. Grund für das fehlerhafte Auswachsen der Gliazellen ist möglicherweise das defekte PNS in *schizo*-Mutanten. Das Auswachsen der Motoraxone des PNS wird neben den Gliazellen durch die Expression von Wachstumsfaktoren in Muskeln gesteuert. So wird beispielsweise der repulsive Netrin-Rezeptor UNC-5 in *Drosophila* im Segmentalen Nerv (SN), der „*exit glia*“ und den peripheren Gliazellen exprimiert. Die „*exit glia*“ liegt am Rand des ZNS und umschließt die axonalen Trakte, die das ZNS verlassen. SN-Motoraxone, die UNC-5 exprimieren, vermeiden die Mittellinienzellen und periphere Muskeln, die Netrin exprimieren (Keleman & Dickson, 2001). Welche Funktion das Gen *schizo* bei der axonalen Wegfindung der peripheren Axone spielt, muß allerdings noch geklärt werden.

4.1.3 Die Rolle von *schizo* bei der Bildung des Mitteldarms

Der Mitteldarm von *Drosophila* entsteht aus zwei Keimblättern, dem visceralem Mesoderm und dem Endoderm. Es existieren zwei endodermale Anlagen am anterioren und posterioren Ende des Embryos, die während des Keimstreifenrückzugs aufeinander zuwachsen. Das viscerale Mesoderm bildet die Unterlage für die migrierenden endodermalen Zellen. Mutationen in Genen, die an der Spezifizierung des visceralen Mesoderms beteiligt sind, zeigen Defekte in der Bildung des Mitteldarms (Reuter *et al.*, 1993; Tepass & Hartenstein,

1994). *schizo*-mutante Embryonen des Stadium 16 zeigen einen defekten Mitteldarm, und eine Analyse des visceralen Mesoderms mit Hilfe des mAb FasIII deckte Lücken im visceralen Mesoderm auf.

Es ist bekannt, daß positions-spezifische Integrine (PS-Integrine) an der Migration der Mitteldarmzellen beteiligt sind (Roote & Zusman, 1995). PS2-Integrine (*inflated*) werden für die Bildung des visceralen Mesoderms benötigt, wohingegen PS1- und PS3-Integrine für die Migration der endodermalen Zellen verantwortlich sind (Brown, 1993; Stark *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang konnte auch eine Funktion der kleinen GTPasen Drac1 und Dcdc42 nachgewiesen werden. Drac1 und Dcdc42 sind an der Migration der endodermalen Zellen beteiligt (Martin-Bermudo *et al.*, 1999). Das β -PS-Integrin Myospheroid in *Drosophila* wird kodiert von *myospheroid* (*mys*) und bildet mit den PS2-Integrinen Heterodimere. Eine Analyse von *mys*-Mutanten mit dem mAb FasIII zeigte ähnliche Defekte im visceralen Mesoderm, wie sie in *schizo*-Mutanten beobachtet wurden (siehe Abb. 40B). Doch nicht nur Integrine und ihre Rezeptoren zeigen einen visceralen Mesoderm-Phänotyp, sondern auch *netrin*- und *slit*-Mutanten (Abb. 40D und E). Vertebraten-Slit bindet sowohl an Laminin, Netrin und Glypican (Brose *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1999).

In einer genetischen Analyse im Zentralen Nervensystem von *Drosophila* wurde von Stevens & Jacobs (2002) eine dosisabhängige Interaktion zwischen Integrinen, ihren Rezeptoren und Slit nachgewiesen. Die *netrin A*-RNA wird unter anderem auch im Mesoderm exprimiert, eine Funktion von *netrin* im Mesoderm wurde bisher noch nicht beschrieben. Die phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen *schizo*, Integrinen, *slit* und *netrin* lassen vermuten, daß sie eine wichtige Rolle bei der Bildung des Mitteldarms spielen. Ein mögliches Zusammenspiel dieser Gene bei diesem Prozeß muß noch nachgewiesen werden.

4.2 Die molekulare Analyse des Gens *schizo*

Die phänotypische Analyse mutanter *schizo*-Embryonen deckte sowohl axonale Wegfindungsdefekte als auch Defekte im visceralem Mesoderm auf. Nur wenige Faktoren

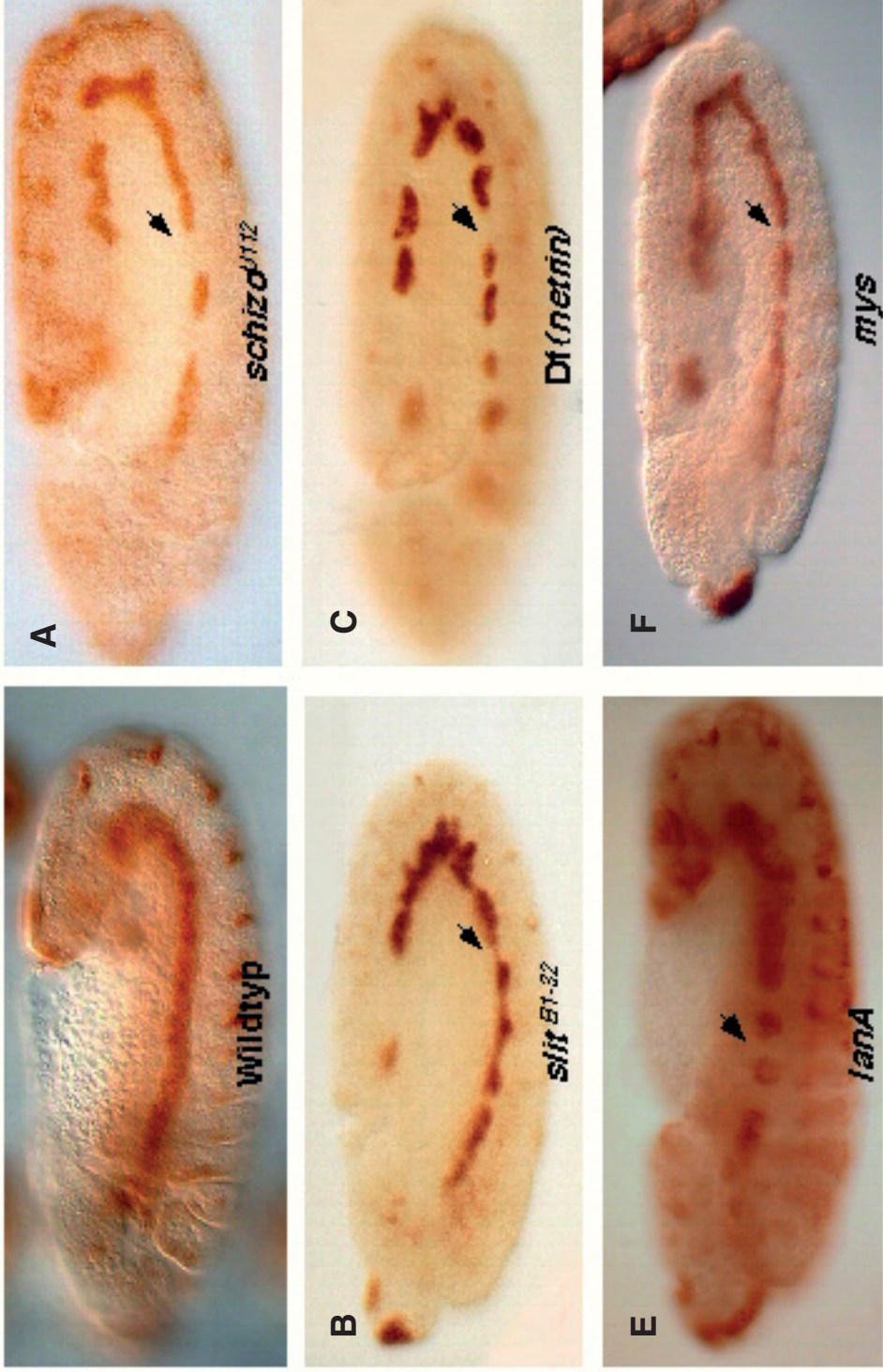


Abb. 40 Defekte im visceralen Mesoderm. Whole mount-Antikörperfärbung an Stadium 10 bis 12 Embryonen mit dem anti-FasIII Antikörper. (A) Mutationen in *schizo* weisen Defekte im visceralen Mesoderm auf (Pfeil). Ähnliche Defekte sind in Mutationen von (B) *slit^{B1-32}*, (C) *netrin*, (E) *laminin A (lana)* und (F) *mysospheroid (mys)* zu beobachten (siehe Pfeile).

sind bislang identifiziert worden, die eine Rolle in der axonalen Wegfindung spielen. Um die Funktion von *schizo* besser zu verstehen, wurde *schizo* molekular untersucht. Durch meiotische Rekombination konnte *schizo* auf den linken Arm des dritten Chromosoms in die Region 78A-B lokalisiert werden. Die Identifizierung der P-Element-Insertionslinie *l(3)3* und die Induktion neuer P-Element-Insertionen im *schizo*-Lokus erlaubten die molekulare Kartierung und die Klonierung der genomischen Region des putativen *schizo*-Lokus. Es wurden zwei cDNAs (LP01489 und RE44556) identifiziert, die sich von zwei verschiedenen *schizo*-Transkripten ableiten lassen. Die Expression der beiden *schizo*-RNAs ist mit dem im ZNS beobachteten Phänotyp zum größten Teil zu vereinbaren (Abb. 27). Die beiden *schizo*-Isoformen könnten in den ZNS-Neuronen und den Mittelliniengliazellen unterschiedliche Funktionen übernehmen. Um zu klären, ob die Isoformen differentiell exprimiert werden wurde der Teil der cDNA RE44556, der in der cDNA LP01489 nicht vorhanden ist, zur Generierung einer Sonde zum RNA-Expressionsnachweis verwendet. Mit Hilfe dieser 5'-Sonde der RE44556 cDNA wurde untersucht, ob sich die beiden Transkripte in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Da es mit dieser Sonde nicht möglich war ein Signal zu erhalten ist unklar, ob die *schizo*-Isoformen differentiell exprimiert werden. Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen in welchen Zellen die zweite *schizo*-Isoform benötigt wird, ist die Durchführung von Rettungsexperimenten.

Die Rettung des *schizo*-Phänotyps durch Überexpression der LP01489 cDNA, die das *schizo* *tl*-Transkript definiert, in den Zellen der Mittellinie hat gezeigt, daß *schizo* in diesen Zellen benötigt wird.

Die ektopische Expression von *schizo* in den dorsozentralen mechanosensorischen Organen führt zu einem Verlust der Macrochaeten auf dem Notum. Die proneuralen Cluster im Notum der Flügelimaginalscheibe, aus denen Macrochaeten hervorgehen, werden durch die Expression des *Drosophila* TGF- β Homologs *decapentaplegic* (*dpp*) induziert. Die Überexpression von *dpp* induziert ein zusätzliches dorsozentrales proneurales Cluster, und der Funktionsverlust von *dpp* resultiert in einer Inhibierung des dorsozentralen proneuralen

Clusters (Tomoyasu *et al.*, 1998). In der *dpp*-Expressionsdomäne ist auch das *schizo t1*-Transkript exprimiert.

Die Überexpression von UAS-*schizo* im Auge führt zu einem rauhen Augen-Phänotyp. Eine Funktion von *schizo* in der Augenentwicklung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Abschwächung des Phänotyps von homozygoten *GMR-GAL4*; UAS-*schizo* Tieren war durch eine Reduktion der *schizo*-Dosis nicht möglich, und der Verlust der *schizo*-Funktion im Auge konnte nicht untersucht werden. Dazu hätte man mittels des FRT/FLP-Systems aus der Hefe *schizo*-mutante Klone im Auge induzieren müssen (Xu & Rubin, 1993). Da das Gen *schizo* in der Nähe der FRT-Insertion lokalisiert, war es nicht möglich, eine Rekombinante herzustellen.

Das Komplexauge entwickelt sich aus dem Primordium der Augenimaginalscheibe während des Larvalstadiums. In homozygoten *GMR-GAL4*; UAS-*schizo* Augenimaginalscheiben kommt es zur Migration der Photorezeptorzellen in den optischen Stiel. Die Funktion von *dpp* wird auch während der Entwicklung des Auges benötigt. Ein Funktionsverlust von *dpp* führt zu einem teilweisen oder völligen Verlust des Auges (Spencer *et al.*, 1982; Wharton *et al.*, 1996; Chanut & Herberlein, 1997a). Die Differenzierung der Photorezeptorzellen beginnt am posterioren Ende der Augenimaginalscheibe durch die Induktion der morphogenetischen Furche (MF). Bedingt durch Zytoskelettlagerung und Kernwanderung zum apikalen Pol verkürzen sich die Zellen, so daß in der epithelialen Oberfläche eine Einbuchtung entsteht, die sich nach anterior fortpflanzt. Vor der MF sind die Zellen noch undifferenziert, doch Zellen, die posterior der Furche liegen, befinden sich in unterschiedlichen Differenzierungsstadien, je nachdem wie weit sie von der MF entfernt sind. Das Gen *dpp* wird entlang der posterioren Grenze der Augenscheibe vor der MF exprimiert (Masucci *et al.*, 1990). Außerdem führt die Überexpression von *dpp* am anterioren Rand der Augenscheibe zu einer ektopischen MF (Chanut & Herberlein, 1997b; Pignoni & Zipursky, 1997). *schizo* ist ebenfalls in der MF exprimiert (Abb. 28). Sowohl in der imaginalen Flügelscheibe als auch in der Augenscheibe werden *schizo* und *dpp* in den gleichen Domänen exprimiert. Falls *schizo* eine Rolle in der

Aktivierung bzw. Reprimierung des *dpp*-Signalwegs im Notum und in der MF spielt, sollte man eine Veränderung der *dpp*-Verteilung bei der Überexpression von *schizo* in diesen Bereichen beobachten.

4.3 *schizo* als *Drosophila* Sec7 Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor

Die Schizo Proteine P1 und P2 zeigen drei konservierte Domänen und gehören zur Familie der Sec7 Guanine-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF). Beide Schizo-Proteine weisen in den Motiven 1 und 2 der Sec7-Domäne starke Homologien zu anderen Mitgliedern der Sec7-Familie auf (Tabelle 4), die in den restlichen Sequenzen stark divergieren. Die Schizo-Proteindomäne ist in verschiedenen Spezies konserviert. Es existieren Homologe in *Anopheles* und Säugern, nur in *C. elegans* konnten keine Homologe identifiziert werden. Das humane *schizo*-Homolog ARF-GEP₁₀₀ besitzt neben der Sec7-Domäne noch eine IQ- und PH-Domäne genau wie die beiden Schizo-Proteine. Das zweite humane Homolog EFA6 dagegen enthält anstatt der IQ-Domäne eine coiled coiled (cc)-Domäne und wurde nicht weiter untersucht. ARF-GEP₁₀₀ kodiert für ein 841 aa großes Protein und ist in den Leukozyten, dem Gehirn und der Milz exprimiert (Someya *et al.*, 2001). Aufgrund der Sequenz-Homologie wurde das 2,2 kb EcoRI/Not-Fragment der ARF-GEP₁₀₀ cDNA (KIAA0763), das den ORF enthält, in den *Drosophila* Expressionsvektor pUAST kloniert, um zu untersuchen, ob ARF-GEP₁₀₀ eine ähnliche Funktionen wie Schizo in *Drosophila* ausüben kann. Drei der vier erhaltenen Insertionen sind homozygot und befinden sich auf dem 3. Chromosom, die vierte Insertion lokalisiert auf dem X-Chromosom.

Die Überexpression von ARF-GEP₁₀₀ im Auge und im Nervensystem mit Hilfe von *GMR*-, *ey*- und *sca-GAL4* führten nicht zu den nach Überexpression von *schizo* beobachteten Defekten. Die Funktion von ARF-GEP₁₀₀ und Schizo ist wahrscheinlich nicht konserviert genug, um mit ARF-GEP₁₀₀ in *Drosophila* ähnliche Defekte zu erzielen wie mit Schizo.

Von Derrien *et al.* (2002) wurde ein weiteres EFA6-Homolog identifiziert, EFA6B. Vermutlich umfaßt die Familie der EFA6 GEFs noch zwei weitere Mitglieder. Durch

Überexpressionsstudien mit der C-terminalen Region, die die PH-Domäne beinhaltet, konnte gezeigt werden, daß diese Region in Abwesenheit der Sec7-Domäne an der Ausstülpung von Mikrovilli beteiligt ist.

Um die Funktion der Sec7- und der PH-Domäne in Schizo zu untersuchen, wurden Deletionskonstrukte erstellt. Die Überexpression der Deletionskonstrukte im Nervensystem *Drosophila* zeigten allerdings keine Phänotypen.

4.3.1 Die Funktion der ARF-GTPase ARF6

Für die humanen *schizo*-Homologe EFA6 und ARF-GEP₁₀₀ wurde eine erhöhte Bindungsaffinität für den ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (ARF6) nachgewiesen, einem Ras-verwandten GTP-bindendem Protein (Franco *et al.*, 1999; Someya *et al.*, 2001). Es ist daher zu vermuten, daß Schizo den Austausch von GDP/GTP an ARF6 katalysiert. ARF6 in *Drosophila* wurde mittels Homologiesuche identifiziert. Um zu untersuchen, ob das *Drosophila*-ARF6 im gleichen Muster exprimiert wird wie das Gen *schizo*, wurden *whole mount*-RNA-*in situ*-Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen mit dem ARF6-Transkript durchgeführt. ARF6 ist während der gesamten Embryogenese jedoch ubiquitär exprimiert. Da es bisher noch keine Mutationen für ARF6 in *Drosophila* gibt, wurde das 1,2 kb große EcoRI/BglII-Fragment der ARF6-cDNA in den pUAST-Expressionsvektor kloniert, um anschließend Überexpressionsstudien durchzuführen. Insgesamt wurden vier transgene Linien erhalten, die alle homozygot vital sind und auf dem 3. Chromosom inseriert sind. Das UAS-ARF6 Konstrukt wurde mit der Treiberlinie *GMR*- und *da-GAL4* überexprimiert. Die ektopische Expression im Auge zeigte keinen Phänotyp. Die meisten GTPasen zeigen bei der Überexpression nur einen Phänotyp im aktivierten Zustand. So verursacht z. B. die Überexpression von aktiviertem Cdc42 im Auge einen rauhen Augen-Phänotyp. In diesem Zusammenhang wäre die Expression eines attraktiven ARF6 oder eines dominant-negativen ARF6 interessant gewesen. Die Überexpression von UAS-ARF6 mit der Treiberlinie *da-GAL4* führt zur pupalen Letalität.

Aus der Literatur ist bekannt, daß ARF6 an der Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts und an der Zellmigration von Epithelzellen beteiligt ist (Palacios *et al.*, 2001; Santy & Casanova, 2001). Um auf Wachstumssignale reagieren zu können, muß der axonale Wachstumskegel in der Lage sein, Aktin-Zytoskelett-Veränderungen vorzunehmen, um sich entweder auf ein attraktives Signal hinzubewegen oder sich auf Grund eines repulsiven Signals zurückzuziehen. Außer den axonalen Defekten in *schizo*-Mutanten wurden zudem noch Migrationsdefekte in den Mittelliniengliazellen und den peripheren Gliazellen beobachtet.

ARF6 wirkt an der apikalen Zelloberfläche und stimuliert dort die Endozytose (Altschuler *et al.*, 1999). Bindet ein Ligand an einen Rezeptor, so wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase ein spezifischer GEF aktiviert und an die Membran gebracht, der wiederum die ARF6-GTPase aktiviert. Bekannte GEFs für ARF6 sind ARNO und EFA6. Welcher der beiden GEF an der epithelialen Zelloberfläche wirkt, ist noch nicht genau bekannt. Für ARF6 gibt es mehrere Effektoren (Jackson & Casanova, 2000), die die Dosis von negativ geladenen Phospholipiden erhöhen, die wiederum mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie interagieren (Abb. 41).

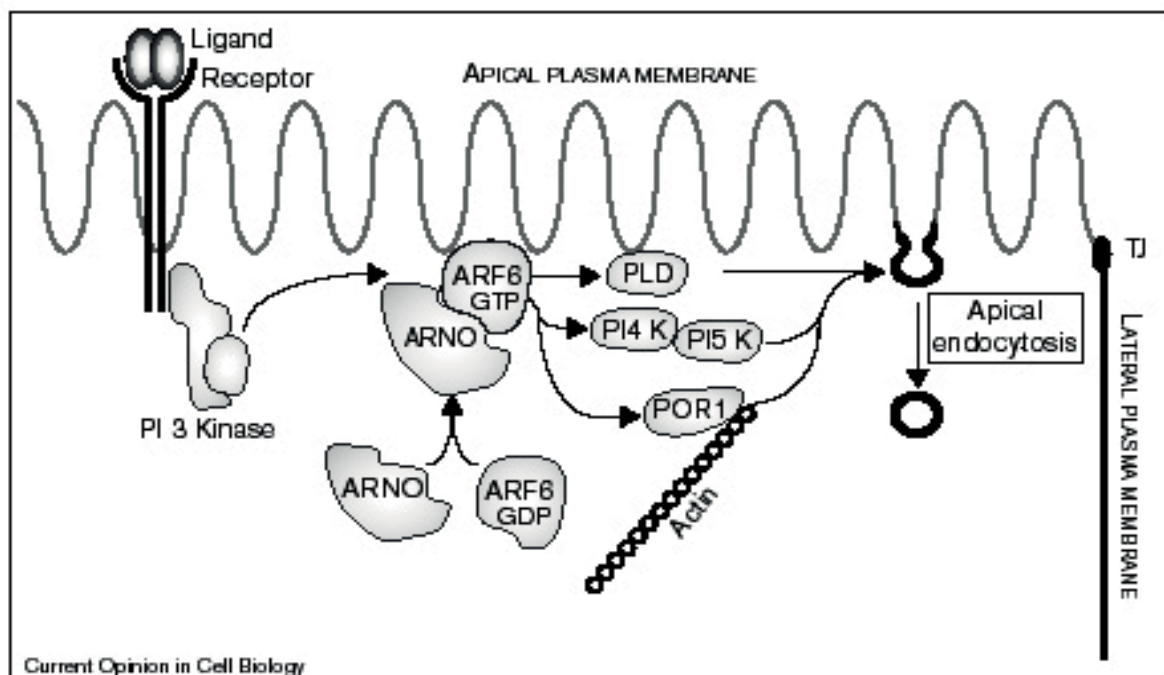


Abb. 41 Regulation der apikalen Endozytose durch ARF6 (nach Mostov *et al.*, 2000).

4.3.2 Ist *schizo* an der Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt?

4.3.2.1 Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts durch die Aktivierung des ADP-Ribosylierungsfaktors 6

Membranbewegungen zur Zelloberfläche hin und die Reorganisation des Zytoskeletts stellen wichtige Prozesse für das Auswachsen des Axons dar, damit es auf die Signale seiner Umwelt reagieren kann. Für ARF6 konnte zusammen mit der Rho GTPase Rac1 eine regulatorische Funktion bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen werden (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Radhakrishna *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Boshans *et al.*, 2000; Al-Awar *et al.*, 2000). Rac1 ist an der Membran aktiv und zirkuliert zwischen der Plasmamembran (PM) und den endosomalen Vesikeln (Radhakrishna & Donaldson, 1997). Die Aktivität von ARF6 wird benötigt, um Rac wieder an die PM zu bringen, wodurch eine Änderung des Aktin-Zytoskeletts bewirkt wird (Radhakrishna *et al.*, 1999). In einer Analyse von Boshans *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, daß das bioaktive Peptid Bombesin die Aktivierung von ARF6 durch das G-Protein G α q induziert, das einen für ARF6 spezifischen GEF aktiviert. Außerdem wurde eine antagonisierende Wirkung von ARF6 auf RhoA festgestellt. Eine ähnliche Funktion von ARF6 konnte auch während der Phagozytose in Makrophagen beobachtet werden (Zhang *et al.*, 1999).

Eine Interaktion von *Drosophila* ARF6 und Rac1 bzw. RhoA konnte nicht untersucht werden, da bisher noch keine aktivierten bzw. dominant-negativen Form von ARF6 existiert. Eine Interaktion von *schizo* mit aktiviertem Rac1 konnte nicht gezeigt werden. Der durch Überexpression von aktiviertem Rac1 mit *GMR-GAL4* hervorgerufene rauhe Augen-Phänotyp, ließ sich nicht durch Entfernung einer Kopie *schizo* verstärken oder abschwächen.

4.3.2.2 Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts durch die kleine GTPase *Dcdc42*

Die Verstärkung des aktivierten Cdc42-Phänotyps im Auge von *Drosophila* durch eine

Verringerung der *schizo*-Dosis deutet darauf hin, daß *schizo* möglicherweise seine Funktion über das GTP-bindende Protein Cdc42 ausübt. Für das zur Subfamilie der Rho GTPasen gehörende Cdc42 wurden mehrere putative Zielproteine identifiziert, wie die p21-aktivierenden Kinasen (PAKs), das Wiscott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) und IQGAP (Manser *et al.*, 1995; Bagrodia *et al.*, 1995; Symons *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1996), die an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Zellmorphologie beteiligt sind. In einer erneuten Suche nach Komponenten, durch die Cdc42 das Zellwachstum oder die maligne Transformation reguliert, wurde die γ -Untereinheit des Coatamer-Komplexes (γ COP) als Bindungspartner für aktiviertes Cdc42 isoliert (Wu *et al.*, 2000). Dieser Komplex ist für den intrazellulären Vesikeltransport von Bedeutung, da er sich mit Hilfe des GTP-bindenden Proteins ARF an die Membran des Golgis anlagern kann (Serafini *et al.*, 1991; Waters *et al.*, 1991; Rothman, 1994). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß Aktin und der Aktin-Signalweg wichtig für die Funktion des Golgiapparates sind. Die Lokalisation von Cdc42 ist abhängig von aktiviertem ARF, in ARF-Mutanten ist die Lokalisation von Cdc42 an den Golgi reduziert (Erickson *et al.*, 1996). Das Modell in Abb. 42 zeigt die Komponenten, die im Golgi und an der Plasmamembran am Vesikeltransport beteiligt sind.

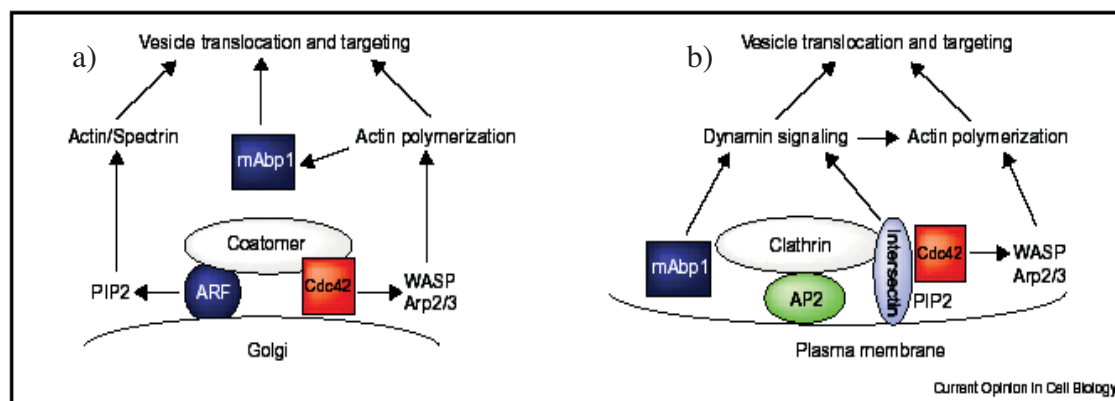


Abb. 42 Mechanismus der Aktin-Verteilung bei der Vesikelbildung im Golgi und an der Plasmamembran (nach Stamnes, 2002). (a) Am Golgi stimuliert aktiviertes ARF die Produktion von Phosphatidylinisitol-Diphosphat (PIP2) durch die Phosphatidylinisitol-4-Kinase (Godi *et al.*, 1998, Godi *et al.*, 1999) Durch die Bindung von Cdc42 an den Coatamer-Komplex wird die GTPase an den Golgi lokalisiert. Dadurch lagert sich das Aktin-bindende Protein mAbp1 an den Golgi-Apparat. Spektrin, Cdc42, WASP und mAbp1 sind am Proteintransport im frühen sekretorischen Weg beteiligt. (b) Bei der Endozytose von der Plasmamembran bindet mAbp1 und andere SH3-Domänen-Proteine an Dynamin (Schafer, 2002; Qualmann *et al.*, 2000).

Der Regulation des Aktin-Zytoskeletts liegt eine komplexe Maschinerie zu Grunde, an der die GTPasen Cdc42 und ARF mitwirken. Schizo, ein putatives GEF für ARF-GTPasen, interagiert mit der aktivierten Form von Cdc42. Die Reduktion der *schizo*-Dosis führt zu einer Verstärkung des Augen-Phänotyps von aktiviertem Cdc42. Der Verlust von Dcdc42 und *schizo* äußert sich in einem dramatischen ZNS-Phänotyp, bei dem keine Kommissuren mehr gebildet werden (Abb. 33). Es ist möglich, daß Schizo durch die Aktivierung beider GTPasen an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist.

Müsch *et al.* (2001) konnten zeigen, daß Cdc42 am apikalen und basolateralen Transport von Proteinen sowie an der Regulation der Orientierung des Golgi-Apparates und an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt ist (Palazzo *et al.*, 2001).

Auch ARF6 ist am apikalen Vesikeltransport beteiligt, und für das in *Arabidopsis* identifizierte Sec7-Homolog *gnom* (Mayer *et al.*, 1991) konnte eine regulatorische Funktion in der Zellpolarität gezeigt werden. In *gnom*-Mutanten ist die Zellpolarität entlang der apikal-basalen Achse defekt (Steinmann *et al.*, 1999). Bedingt durch den Gnom-abhängigen Vesikeltransport wird der „*efflux carrier*“ PIN polar lokalisiert.

Die ektopische Expression von Schizo im Auge hat eine Migration der Photorezeptorzellen zur Folge und der in *schizo*-Mutanten beobachtete Darmdefekt könnte durch Polaritätsdefekte im visceralen Mesoderm hervorgerufen werden. Das Schizo Protein P1 ist unter anderem auch in den Polzellen exprimiert, die vom posterioren Pol des Embryos während der Morphogenese der Gonaden durch das Innere des Embryo in das somatische Gonadengewebe einwandern. Komponenten, die an der Migration der Polzellen beteiligt sind, wurden bereits identifiziert (Zhang *et al.*, 1997; van Doren *et al.*, 1998). Ob Schizo tatsächlich eine Rolle bei der Migration der Keimzellen spielt, muß noch untersucht werden. Es gibt jedoch Hinweise, daß Schizo sowohl an der Etablierung der Zellpolarität als auch an Migrationsprozessen beteiligt sein könnte.

4.4 Eine mögliche Funktion von *schizo* in der Endozytose bei der Kontrolle der Roundabout-Expression

Die Sec7-Domäne zeigte ursprünglich Homologien zu dem aus Hefe identifizierten Sec7-Protein. In der Hefe ist das Sec7-Protein am Vesikeltransport zwischen Endoplasmatischem Reticulum (ER) und Golgi beteiligt (Achstetter *et al.*, 1988; Franzusoff *et al.*, 1992). Signalwege können mit Hilfe der Endozytose auf unterschiedliche Art und Weise reguliert werden (Seto *et al.*, 2002). Die Rezeptor-Regulation durch Endozytose erfolgt jedoch durch unterschiedliche Mechanismen. So kann die Endozytose wie im Falle der Rezeptor Tyrosin-Kinasen (RTK) das Signal am Endosom verstärken oder durch Sortierung in Lysosomen herunterregulieren (Wiley & Burke, 2001). Das Wingless-Protein und der TGF- β bilden durch den Vorgang der Transzytose einen morphogenen Gradienten, dessen Grenzen durch das Recyclern und Degradieren von Signalmolekülen festgelegt werden (Teleman *et al.*, 2001). Durch die Endozytose können aber auch Rezeptoren aktiviert werden, wie z.B. der Rezeptor Notch (Parks *et al.*, 2000).

Auch bei der axonalen Wegfindung spielt die Endozytose eine wichtige Rolle. Das Transmembranprotein Commissurless (Comm) ist nach neusten Erkenntnissen an der Regulation des intrazellulären Verkehrs von Robo beteiligt (Keleman *et al.*, 2002; Myat *et al.*, 2002). Demnach wirkt Comm entgegen früheren Vorstellungen zell-autonom (Georgiou & Tear, 2002; Keleman *et al.*, 2002) und wird in den Neuronen exprimiert, die die Mittellinie kreuzen. Comm ist in der Lage, an Robo zu binden und ist in den Neuronen für die Sortierung von Robo in Endosomen und Lysosomen zuständig, was zu einer Degradierung des Rezeptors führt. An diesem Prozeß ist die *Drosophila* Ubiquitin Ligase Nedd4 beteiligt. Die Bindung von *Drosophila* Nedd4 an Comm und die daraus folgende Ubiquitinierung von Comm leiten wahrscheinlich die Degradierung des Comm/Robo-Komplexes ein (Myat *et al.*, 2002).

Aktiviertes ARF6 ist an der Rekrutierung von Rac1 an die PM beteiligt (Radhakrishna & Donaldson, 1997). Auch der Slit-Rezeptor Robo muß an die Membran des auswachsenden Axons transportiert werden. Eine mögliche Funktion von Schizo könnte daher der Transport

von Robo an die PM sein. Die Reduktion der Robo-Dosis in homozygot mutanten *schizo*-Embryonen führt aber zur Wiederausbildung der anterioren Kommissur. Es ist daher denkbar, daß Schizo am Prozeß des intrazellulären Transport von Robo beteiligt ist.

Die Rettungsexperimente haben allerdings gezeigt, daß Schizo P1 in den Mittelliniengliazellen benötigt wird und nicht in den neuronalen Zellen des ZNS, in denen *robo* exprimiert wird. Zudem wurde eine regulatorische Funktion von Schizo auf Slit nachgewiesen. Die Aktivität des Robo-Rezeptors wird daher vermutlich nicht direkt von Schizo reguliert, sondern indirekt über die *slit*-Dosis. Welche Rolle Schizo in diesem Zusammenhang tatsächlich spielt, ließe sich anhand von Zellkulturexperimenten mit Slit, Robo und Schizo nachweisen. Auch ließe sich mit einem solchen Experiment klären, ob die beiden Schizo Proteine eine unterschiedliche Funktion bei der Regulation des Slit-Robo-Signalsweges ausüben.

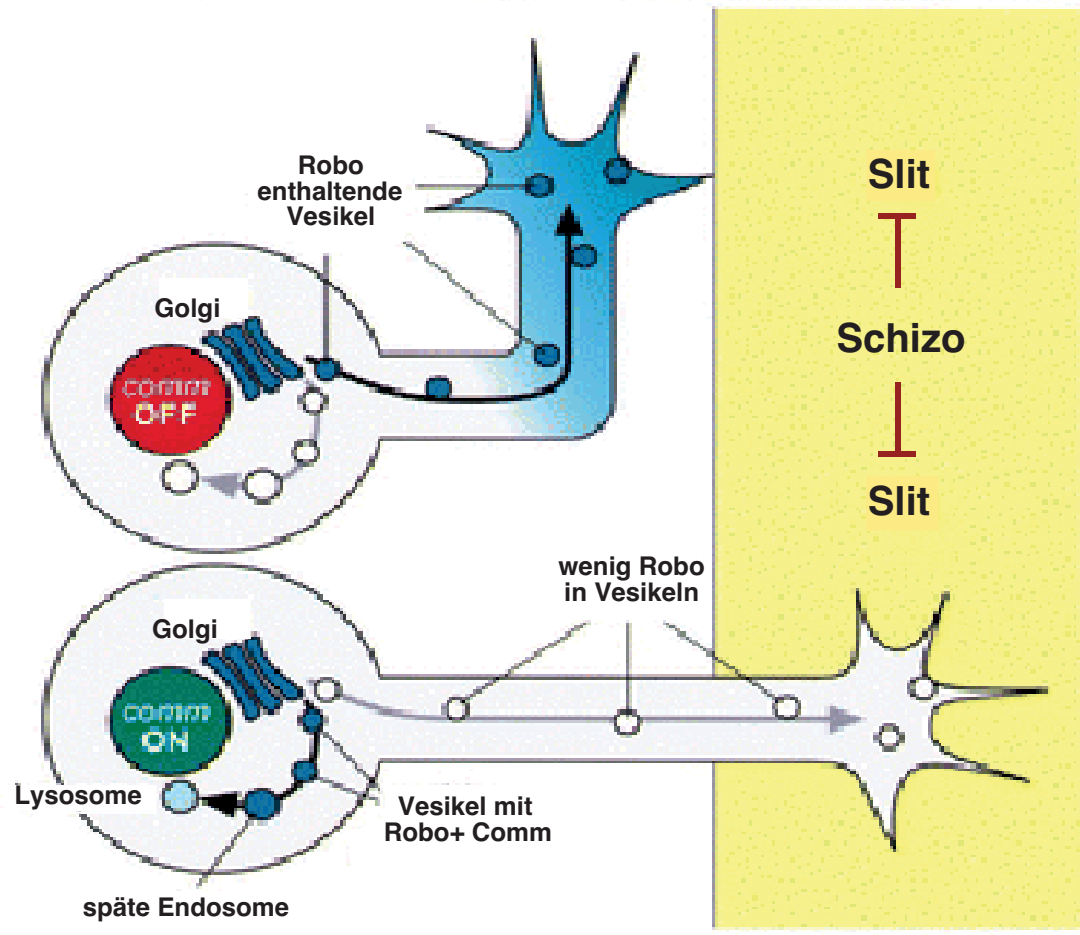


Abb. 43 Ansätze eines Modells für die Wirkungsweise von Schizo. Schizo reguliert die Slit-Expression, z. B. durch Rekrutierung von Slit an die Plasmamembran. Die Expression des Robo-Rezeptors ist wahrscheinlich abhängig von der Expression des Liganden.

4.5 Die Interaktion von *calmodulin* und *schizo*

Calcium und der intrazelluläre Calcium-Rezeptor Calmodulin (CaM) sind an der Regulation des Wachstumsverhaltens des Axons beteiligt (Archer *et al.*, 1999; Goldberg & Grabham, 1999; Gomez & Spitzer, 2000). Die Schizo-Aminosäuresequenz weist eine Calmodulin-Domäne auf und es wurde daher analysiert, ob *schizo* genetisch mit *cam* interagieren kann. In *cam*-Mutanten kommt es zu einer vermehrten Kreuzung von Axonen an der Mittellinie. In der mAb BP102-Färbung zeigen *cam*-mutante Embryonen ein verschmälertes ZNS, in dem die Kommissuren reduziert sind. *schizo/cam* Embryonen zeigen einen synergistischen Effekt. Die Expression des CaM-Inhibitor, auch bekannt als Kinesin-Anatagonist (KA), führt zu einer Reduktion der endogenen CaM Aktivität. Doppelmutantenanalysen mit KA und den Komponenten des repulsiven Systems *robo* und *slit* zeigten einen synergistischen Effekt (Fritz & VanBerkum, 2000). Vermutlich wird CaM durch die Bindung von Slit an den Rezeptor Robo aktiviert. Schizo wirkt antagonistisch auf Slit, was bedeutet, daß die Expression von Slit in *schizo/cam* Doppelmutanten verstärkt ist. Da *cam* im Slit-Robo-Signalweg involviert ist, sollte ein synergistischer Effekt, wie er in *slit/cam* Doppelmutanten beobachtet wurde, nicht in *schizo/cam* Mutanten zu sehen sein. Das Ergebnis der *schizo/cam* Doppelmutantenanalyse steht somit im Widerspruch zu den unter 4.1 diskutierten Ergebnissen. Der genaue Mechanismus, durch den CaM an der Regulation der axonalen Wegfindung beteiligt ist, ist jedoch noch unklar und folglich auch die Rolle, die das Gen *schizo* in diesem Zusammenhang spielt.

5. Zusammenfassung

Die Ausbildung des kommissuralen Axonmusters im embryonalen Nervensystem wird von den Genen zweier bekannter Signalmechanismen kontrolliert, Netrin und Slit. In einer detaillierten genetischen Analyse wurde das Gen *schizo* identifiziert, dessen Verlust zu einer Reduktion der Kommissuren führt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die genetische und molekulare Charakterisierung des Gens *schizo* während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila*.

Der erste Teil der Arbeit bestand in einer phänotypischen und genetischen Analyse von *schizo*. In diesem Zusammenhang konnte eine Interaktion von *schizo* und *slit* nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression des repulsiven Faktors Slit in *schizo*-mutanten Embryonen läßt eine regulatorische Funktion von *schizo* auf *slit* vermuten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde *schizo* molekular untersucht. Die Identifizierung der *schizo*-Transkriptionseinheit hat gezeigt, daß *schizo* zwei Transkripte kodiert, die sich in der 5'-Region unterscheiden, aber ein gemeinsames 3'-Ende aufweisen. Das *schizo t1*- und *t2*-Transkript wird in den neuronalen Zellen des ZNS und den Mittelliniengliazellen exprimiert und die daraus abgeleiteten *schizo*-Proteine weisen drei konservierte Domänen auf: IQ-, Sec7- und PH-Domäne. Die Sec7-Domäne ist charakteristisch für die Familie der Sec7-Guanine-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF), die an der Aktivierung der Adenosin-Ribosylierungsfaktoren (ARF) beteiligt sind. Die Rettung des *schizo*-mutanten ZNS-Phänotyps durch die Überexpression des *schizo t1* UAS-Konstrukts in den Zellen der Mittellinie hat gezeigt, daß die Funktion von *schizo* in den Mittelliniengliazellen benötigt wird.

Die Schizo Homologe sind an der Aktivierung der ARF6 GTPase beteiligt, die eine Rolle im apikal gerichteten Vesikeltransport und an der Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts spielen. Es ist anzunehmen, daß Schizo eine ähnliche Funktion wie seine Homologe ausübt.

6. Literatur

- Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C. and Schekman, R. (1988).** SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 263, 11711-11717.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M. *et al.* (2000).** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.
- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N. N. and Donaldson, J. G. (2000).** Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Mol. Cell Biol.* 20, 5998-6007.
- Altschul, S. F., Koonin, E. V. (1998).** Iterated profile searches with PSI-BLAST--a tool for discovery in protein *databases*. *Trends Biochem. Sci.* 23, 444-447.
- Altschuler, Y., Liu, S.-H., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F. and Mostov, K. (1999).** ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 147, 7-12.
- Archer F. R., Doherty P., Collins D. and Bolsover, S. R. (1999).** CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3565-3573.
- Azpiazu, N. and Frasch, M. (1993).** Tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* 7, 1325-1340.
- Baass, P. C., Di Guglielmo, G. M., Authier, F., Posner, B. I. and Bergeron, J. J. M. (1995).** Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol.* 5, 465-470.
- Bagrodia, S., Taylor, S. J., Creasy, C. L., Chernoff, J. and Cerione, R. A. (1995).** Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 22731-22737.

- Bajno, L., Peng, X. R., Schreiber, A. D., Moore, H. P., Trimble, W. S. and Grinstein, S. (2000).** Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of Phagosome formation. *J. Cell Biol.* 149, 697-706.
- Bandtlow, C. E., Schmidt, M. F., Hassinger, T. D., Schwab, M. E., and Kater, S. B. (1993).** Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science* 259, 80–83.
- Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. and Goodman, C. S. (2000).** Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the Roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.
- Bate, C. M. (1976).** Pioneer neurones in an insect embryo. *Nature* 260, 54-55.
- Battye, R., Stevens, A. and Jacobs, J. R. (1999).** Axon repulsion from the midline of the *Drosophila* CNS requires slit function. *Development* 126, 2475-2481.
- Battye, R., Stevens, A., Perry, R. L. and Jacobs, J. R. (2001).** Repellent signaling by Slit requires the leucine-rich repeats. *J. Neurosci.* 21, 4290-4298.
- Béraud-Dufour, S., Robineau, S., Chardin, P., Paris, S., Chabre, M., Cherfils, J. and Antony, B. (1998).** A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the γ -phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J.* 17, 3651–3659.
- Bodmer, R., Barbel, S., Sheperd, S., Jack, J. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1987).** Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of *D. melanogaster*. *Cell* 51, 293-307.
- Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990).** A new homeobox-containing gene, msh-2, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*. *Development* 110, 661-669.
- Booth, G. E., Kinrade, E. F. V. and Hidalgo, A. (2000).** Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development* 127, 237-244.

- Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (2000).** ADP-ribolysation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* 20, 3685-3694.
- 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, 1895-1906.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M. (1996).** The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 179, 41-64.
- Boube, M., Faucher, C., Joulia, L., Cribbs, D. L. and Bourbon, H. M. (2000).** *Drosophila* homologs of transcriptional mediator complex subunits are required for adult cell and segment identity specification. *Genes Dev.* 14, 2906–2917.
- 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.
- Bretscher, M. S. (1996).** Moving membrane up to the front of migrating cells. *Cell* 85, 465-467.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K.-H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T. (1999).** Evolutionary conservation of the repulsive guidance function of Slit proteins and their interactions with robo receptors. *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, N. H. (1993).** Integrins hold *Drosophila* together. *BioEssays* 15, 383-390.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1985).** The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York.
- Campos-Ortega, J. A. (1993).** Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 24, 1305-1327.
- Ceresa, B. P. and Schmid, S. L. (2000).** Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 204-210.

- Chanut, F. and Herberlein, U. (1997a).** Retinal morphogenesis in *Drosophila*: hints from an eye-specific decapentaplegic allele. *Dev. Genet.* 20, 197-207.
- Chanut, F. and Herberlein, U. (1997b).** Role of decapentaplegic in initiation and progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* retina. *Development* 124, 559-567.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Béraud-Dufour, S., Jackson, C. L. and Chabre, M. (1996).** A human exchange factor for ARF contains a Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481-484.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Béraud-Dufour, S., Antonny, B. and Chardin, P. (1998).** Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* 392, 101-105.
- Colavita A., Krishna, S., Zheng, H., Padgett, R. W and Culotti, J. G. (1998).** Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science* 281, 706-709.
- Colavita, A. and Culotti, J. G. (1998).** Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 194, 72-85.
- Crews, S. T., Thomas, J. B. and Goodman, C. S. (1988).** The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* 52, 143-151.
- Crews, S. T. (1998).** Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 12, 607-620.
- Crowner, D., Madden, K., Goeke, S. and Giniger, E. (2002).** Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development* 129, 1317-1325.
- Dai, J. and Sheetz, M. P. (1995).** Axon membrane flows from the growth cone to the cell body. *Cell* 83, 693-701.
- Daniels, S. B., McCarron, M., Love, C. and Chovnick, A. (1985).** Dysgenesis-induced instability of rosy locus transformation in *Drosophila melanogaster*: analysis of excision events and the selective recovery of control element deletions. *Genetics* 109, 95-117.

- Derrien, V., Couillault, C., Franco, M., Martineau, S., Montcourrier, P., Houlgatte, R. and Chavrier, P. (2002).** A conserved C-terminal domain of EFA6-family ARF6-guanine nucleotide exchange factors induces lengthening of microvilli-like membrane protrusions. *J. of Cell Science* 115, 2867-2879.
- Donaldson, J. G. and Jackson, C. L. (2000).** Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 475-482.
- Dong, Z. and Bell, L. R. (1999).** SIN, a novel *Drosophila* protein that associates with the RNA binding protein Sex-lethal. *Gene* 237, 421-428.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. and Van Aelst, L. (1997).** A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* 16, 5445-5454.
- Erickson, J. W., Zhang, C., Kahn, R. A., Evans, T. and Cerione, R. A. (1996).** Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 271, 26850-26854.
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R. T., Gordon, J. I., Tessier-Lavigne, M. and Weinberg, R. A. (1997).** Phenotype of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (DCC) gene. *Nature* 386, 796-804.
- Fehon, R., Oren, T., LaJeunesse, D. R., Melby, T. E. and McCartney, B. M. (1997).** Isolation of mutations in the *Drosophila* homologues of the human neurofibromatosis 2 and yeast CD42 genes using a simple and efficient reverse genetic method. *Genetics* 146, 245-252.
- Fondell, J. D., Ge, H. and Roeder, R. G. (1996).** Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8329-8333.

- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. and Chavrier, P. (1998).** ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of golgi structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9926-9931.
- Franco M., Peters, P. J. , Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (1999).** EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization *EMBO J.* 18, 1480-1491.
- Frank, S. R., Hatfield, J. C. and Casanova, J. E. (1998).** Remoduling of the actin cytoskeleton is coordnately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol. Biol. Cell* 9, 3133-3146.
- Franzusoff, A., Lauze, E. and Howell, K. E. (1992).** Immuno-isolation of Sec7p-coated transport vesicles from the yeast secretory pathway. *Nature* 355, 173-175.
- Frasch, M. (1995).** Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464-467.
- Fritz, J. L. and VanBerkum, M. F. (2000).** Calmodulin and son of sevenless dependent signaling pathway regulate midline crossing of axons in the *Drosophila* CNS. *Development* 127, 1991-2000.
- Galas, M. C., Helms, J. B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D. and Bader, M. F. (1997).** Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J. Biol. Chem.* 272, 2788-2793.
- Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K. S. and Kolanus, W. (2000).** Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J.* 19, 2525-2536.
- Georgiou, M. and Tear, G. (2002).** Commissureless is required both in commissural neurones and midline cells for axon guidance for axon guidance across the midline. *Development* 129, 2947-2956.

- Giger, R. J. and Kolodkin, A. L. (2001).** Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 105, 1-4.
- Gloor, G. B., Preston, C. R., Johnson-Schlitz, D. M., Nassif, N. A., Phillis, R. W., Benz, W. K., Robertson, H. M. and Engels, W. R. (1993).** Type I repressors of P element mobility. *Genetics* 135, 81-95.
- Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Devarajan, P., Stabach, P. R., Morrow, J. S., Di Tullio, G., Polishchuk, R., Petrucci, T. C., Luini, A. and De Matteis, M. A. (1998).** ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8607-8612.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. and De Matteis, M. A. (1999).** ARF mediates recruitment of PtdIns 4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280-287.
- Goldberg, D. J. and Grabham, P. W. (1999).** Braking news: calcium in the growth cone. *Neuron* 22, 423-5.
- Gomez, T. M. and Spitzer, N. C. (2000).** Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J. Neurobiol.* 44, 174-183.
- Gong, Q., Rangarajan, R., Seeger, M. and Gaul, U. (1999).** The Netrin receptor Frazzled is required in the target for establishment of retinal projections in the *Drosophila* visual system. *Development* 126, 1451-1456.
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q. (1993).** Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In: Bate, C. M. and Martinez-Arias, A. (Eds.), *The development of Drosophila melanogaster*, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 1131-1206.
- Grunwald, I. C. and Klein, R. (2002).** Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 250-259.
- Gu, X. and Spitzer, N. C. (1995).** Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature* 375, 784-787.
- Hall, A. (1998).** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

- Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A. (1996).** Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: Identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 Homologs. *Neuron* 17, 217–228.
- Hart, M. J., Callow, M. G., Souza, B. and Polakis, P. (1996).** IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO J.* 15, 2997-3005.
- Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A. and Cerione, R. A. (1991).** Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354, 311-314.
- Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1989).** Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405.
- Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U. and Reichert, H. (2000).** Expression, regulation and function of the homeobox gene empty spiracles in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *MOD* 90, 143-153.
- Hartmann, C., Landgraf, M., Bate, M. and Jäckle, H. (1997).** Krüppel target gene knockout participates in the proper innervation of a specific set of *Drosophila* larval muscles. *EMBO J.* 16, 5299–5309.
- Hidalgo, A. and Booth, G. E. (2000).** Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 127, 393-402.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y. (1995).** Glia cell missing: A binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* 82, 1025-1036.
- Huang, F., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1991).** The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1087-1095.
- 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.
- Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S, Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J. and Roeder, R. G. (1999).** Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol. Cell* 3, 361-370.
- Jacobs, J. R. (2000).** The midline glia of *Drosophila*: a molecular genetic model for the developmental functions of glia. *Prog. Neurobiol.* 62, 475-508.
- Jacobs, J. R. and Goodman, C. S. (1989a).** Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J. Neurosci.* 9, 2402-2411.
- 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, 2412-2422.
- Jackson, C. L. and Casanova, J. E. (2000).** Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell. Biol.* 10, 60-67.
- Kater, S. B. and Mills, L. R. (1991).** Regulation of growth cone behaviour by calcium. *J. Neurosci.* 11, 891-899.
- Keleman, K. and Dickson, B. J. (2001).** Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* UNC5 netrin receptor. *Neuron* 32, 605-617.
- 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, 415-427.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S. (1991).** Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785-794.
- 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, 205-215.

- Kidd, T., Russell, C. and Goodman, C. S. (1998b).** Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20, 25-33.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S. (1999).** Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785-794.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S. (1991).** The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* 64, 801-815.
- Klaes, A., Menne, T., Stollwerk, A., Scholz, H. and Klämbt, C. (1994).** The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glia cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* 78, 149-160.
- Klarlund, J. K., Guilherme, A., Holik, J. J., Virbasius, J. V., Chawla, A. and Czech, M. P. (1997).** Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-1930.
- 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.
- Krishna, S., Maduzia, L. L. and Padgett, R. W. (1999).** Specificity of TGFbeta signaling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 251-260.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A. M., Stern, B. D., Zhou, Y., Su, M. W., Hedgecock, E. M. and Culotti, J. G. (1992).** UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299.
- Liang, Y., Annan, R. S., Carr, S. A., Popp, S., Mevissen, M., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1999).** Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *J. Biol. Chem.* 274, 17885-17892.

- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994).** Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* 8, 1787-1802.
- Luo, L. (2000).** Trio quartet in *D. melanogaster*. *Neuron* 26, 1-2.
- Manser E., Chong, C., Zhao, Z. S., Leung, T., Michael, G., Hall, C. and Lim, L. (1995).** **Molecular** cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* 270, 25070-25078.
- Martin-Bermudo, M. D., Alvarez-Garcia, I. and Brown, N. H. (1999).** Migration of the *Drosophila* primordial midgut cells requires coordination of diverse PS integrin function. *Development* 126, 5161-5169.
- Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G. and Thoenen, H. (1993).** Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365, 27-32.
- Masucci, J. D., Miltenberger, R. J. and Hoffmann F. M. (1990).** Pattern-specific expression of the *Drosophila* decapentaplegic gene in imaginal discs is regulated by 3' cis-regulatory elements. *Genes Dev.* 4, 2011-2023.
- Matter, K. and Mellman, I. (1994).** Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 545-554.
- Mayer, U., Torrez-Ruiz, R. A., Berleth, T., Misera, S. and Jürgens, G. (1991).** Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* 353, 402-407.
- 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, 4949-4958.
- Merritt, D. J. and Whitington, P. M. (1995).** Central projections of sensory neurons in the *Drosophila* embryo correlate with sensory modality, soma position, and proneural gene function. *J. Neurosci.* 15, 1755-1767.
- Ming, G. L., Song, H. J., Berninger B., Holt C. E., Tessier-Levigne M. and Poo M. M. (1997).** cAMP-dependent growth cone turning by netrin-1. *Neuron* 19, 1225-1235.

- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J. (1996).** Genetic analysis of *Netrin* genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17, 203-215.
- Mosesso, E., Gulbis, J. M. and Goldberg, J. (1998).** Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human Arp2/3 and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* 92, 415-423.
- Mostov, K. E., Verges, M. and Altschuler, Y. (2000).** Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 483-490.
- Mueller, B. K. (1999).** Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 351-388.
- Müsch, A., Cohen, D., Kreitzer, G. and Rodriguez-Boulan, E. (2001).** Cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the *trans*-Golgi network. *EMBO J.* 20, 2171-2179.
- 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, 447-459.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S. and Crews, S. T. (1990).** The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63, 63-75.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T. (1991).** The *Drosophila* single minded gene encodes a helix loop helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157-1167.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995).** Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- 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.

- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G. and D'Souza-Schorey, C. (2001).** An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J.* 20, 4973-4986.
- Palazzo, A. F., Joseph, H. L., Chen, Y. J., Dujardin, D. L., Alberts, A. S., Pfister, K. K., Vallee, R. B. and Gundersen, G. G. (2001).** Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.* 11,1536-1541.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R. and Muskavitch, M. A. (2000).** Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
- Patel, N. H., Snow, P. M. and Goodman, C. S. (1987).** Characterization and cloning of Fasciclin III: A glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988.
- Perletti, L., Talarico, D., Trecca, D., Ronchetti, D., Fracchiolla, N. S., Maiolo, A. T. and Neri, A. (1997).** Identification of a novel gene, PSD, adjacent to NFKB2/lyt-10, which contains a Sec7 and pleckstrin-homology domains. *Genomics* 46, 251-259.
- Peyroche, A., Paris, S. and Jackson, C. L. (1996).** Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast GEA1 protein. *Nature* 384, 479-481.
- Pignoni, F. and Zipursky, S. L. (1997).** Induction of *Drosophila* eye development by Decapentaplegic. *Development* 124, 271-278.
- Poulson, D. F. (1950).** Histogenesis, organogenesis, and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. In: Demerec, M. (Ed.), *Biology of Drosophila*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 168-274.
- Qualmann, B., Kessels, M. M. and Kelly, R. B. (2000).** Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150, F111-F116.

- Radhakrishna, H. and Donaldson, J. G. (1997).** ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* 139, 49-61.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. and Donaldson, J. G. (1999).** ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J. Cell Sci.* 112, 855-866.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. (2000).** Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103, 1033-1045.
- Ramón y Cajal, S. (1911).** Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Transl. by L. Azoulay. Maloine, Paris; **(1995)** Cajal's histology of the nervous system of man and vertebrates. (2 Vols.) Transl. by N. and L. W. Swanson. Oxford University Press USA, Oxford – New York.
- Reuter, R., Grunewald, B. and Leptin, M. (1993).** A role for mesoderm in endodermal migration and morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 119, 1135-1145.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. and Birchmeier, C. (1997).** Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-729.
- Romani, S., Jimenez, F., Hock, M., Patel, N. H., Taubert, H. and Jäckle, H. (1996).** Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene, participates in the specification of neurons and glial cells. *Mech. Dev.* 60, 95-107.
- Roote, C. E. and Zusman, S. (1995).** Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 169, 322-336.
- Roth, P. (1996).** A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12418-12422.
- Rothman, J. E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.

- Santy, L. C. and Casanova, J. E. (2001).** Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J. Cell Biol.* 154, 599-610.
- Schafer, D. A. (2002).** Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 76-81.
- Schimmelpfeng, K., Gögel, S. and Klämbt, C. (2001).** The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech. Dev.* 106, 25-36.
- 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, 186-203.
- Schmidt, A., Chiba, A. and Doe, C. Q. (1999).** Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* 126, 4653-4689.
- 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* 19, 409-426.
- Seeger, M. A. and Beattie, C. E. (1999).** Attraction versus repulsion: modular receptors make the difference in axon guidance. *Cell* 97, 821-824.
- Sepp, K. J., Schulte, J. and Auld, V. J. (2000).** Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* 30, 122-133.
- 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., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996).** Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001-1014.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A. and Rothman, J. E. (1991).** ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 67, 239-53.

- Seto, E. S., Bellen, H. J. and Lloyd, T. E. (2002).** When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev.* 16, 1314-1336.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter R. D. and Goodman, C. S. (2000a).** Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103, 1019-1032.
- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S. (2000b).** Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28, 753-766.
- Sink, H. and Whittington, P. (1991).** Location and connectivity of abdominal motoneurons in the embryo and larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 22, 298-311.
- Someya, A., Sata, M., Takeda, K., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Moss, J. and Vaughan, M. (2001).** ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(5):2413-2418.
- Song, J., Khachikian, Z., Radhakrishna, H. and Donaldson, J. G. (1998).** Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading. *J. Cell Sci.* 111, 2257-2267.
- Spencer, F. A., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M. (1982).** decapentaplegic: A gene affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 28, 451-461.
- Spradling, A. C., Stern, D. M., Kiss, I., Roote, J., Laverly, T. and Rubin, G. M. (1995).** Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10824-10830.
- Stamnes, M. (2002).** Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 428-433.
- Stark, K. A., Yee, G. H., Roote, C. E., Williams, E. L., Zusman, S. and Hynes, R. O. (1997).** A novel α integrin subunit associates with β PS and functions in tissue morphogenesis and movement during *Drosophila* development. *Development* 124, 4583-4594.

- Stein, E. and Tessier-Lavigne, M. (2001).** Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928-1938.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. and Jürgens, G. (1999).** Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316–318.
- Steven, R., Kubiseski, T. J., Zheng, H., Kulkarni, S., Mancillas, J., Morales, A. R., Hogue, C. W. V., Pawson, T. and Culotti, J. (1998).** UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migration in *C. elegans*. *Cell* 92, 785-795.
- Stevens, A. and Jacobs, J. R. (2002).** Integrins regulate responsiveness to Slit repellent signals. *J. Neurosci.* 22, 4448-4455.
- St. Johnston, R. D. and Gelbart, W. M. (1987).** Decapentaplegic transcripts are localized along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 6, 2785-2791.
- Su, M., Merz, D. C., Killeen, M. T., Zhou, Y., Zheng, H., Kramer, J. M., Hedgecock, E.M. and Culotti, J. G. (2000).** Regulation of the UNC-5 netrin receptor initiates the first reorientation of migrating distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 127, 585-594.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo A. (1996).** Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.
- Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C. S. and Seeger, M. (1996).** commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* 16, 501-514.
- Teleman, B. A. A., Strigini, M. and Cohen, S. M. (2001).** Shaping Morphogen Gradients. *Cell* 105, 559-562.
- Tepass, U. and Hartenstein, V. (1994).** Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm. *Development* 120, 579-90.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S. (1996).** The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.

- Thomas, J. B., Bastiani, M. J., Bate, M., and Goodman, C. S. (1984).** From grasshopper to *Drosophila*: a common plan for neural development. *Nature* 310, 203–206.
- Thomas, J. B., Crews, S. T. and Goodman, C. S. (1988).** Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52, 133-141.
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M. and Ueno, N. (1998).** Role of Dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125, 4215-4224.
- Treisman, J. E. (2001).** *Drosophila* homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* 128, 603-615.
- Tsuchiya, M., Price, S. R., Tsai, S. C., Moss, J. and Vaughan, M. (1991).** Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 266, 2772-2777.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997).** Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.
- VanBerkum, M. F. and Goodman, C. S. (1995).** Targeted disruption of Ca(2+)-calmodulin signaling in *Drosophila* growth cones leads to stalls in axon extension and errors in axon guidance. *Neuron* 14, 43-56.
- Van Doren, M., Williamson, A. L. and Lehmann, R. (1998).** Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol.* 8, 243-246.
- Venkateswarlu, K. and Cullen, P. J. (2000).** Signalling via ADP-ribosylation factor 6 lies downstream of phosphatidylinositide 3-kinase. *Biochem. J.* 345, 719-24.
- Wang, Q. and Wadsworth, W. G. (2002).** The C domain of Netrin UNC-6 silences Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase- and diacylglycerol-dependent axon branching in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 22, 2274-2282.
- Waters, M. G., Griff, I. C. and Rothman, J. E. (1991).** Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 615-620.

- Wharton, K., Ray, R. P., Findley, S. D., Duncan, H. E. and Gelbart, W. M. (1996).** Molecular lesions associated with alleles of decapentaplegic identify residues for TGF- β /BMP cell signalling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 142, 493-505.
- Wiley, H. S. and Burke, P. M. (2001).** Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2, 12-18.
- Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., Wu, J. Y., Xiong, W. C. and Rao, Y. (2001).** Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221
- Wu, W. J., Erickson, J. W., Lin, R. and Cerione, R. A. (2000).** The γ -subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* 405, 800-804.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993).** Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*. 117, 1223-1237.
- Yu, T. W. and Bargmann, C. I. (2001).** Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci.* 4, 1169-1176.
- Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K. J., Cheng, Y. and Howard, K. (1997).** The *Drosophila* protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* 385, 64-67.
- Zhang, P. and Spradling, A. C. (1993).** Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* 133, 361-373.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G. and Greenberg, S. (1998).** A requirement for ARF6 in fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 19977-19981.
- Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H. and Greenberg, S. (1999).** ARF6 is required for growth factor- and Rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to Rac membrane targeting. *Mol. Cell Biol.* 19, 8158-8168.
- Zheng, J. Q. (2000).** Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular Ca²⁺ ions. *Nature* 403, 89-93.

7. Anhang

Abkürzungen

aa	Aminosäuren
AK	Antikörper
AMP	Ampicilin
ARNO	ARF nucleotide-binding site opener
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BFA	Brefeldin A
DAB	Diaminobenzidin
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxiginin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleotid
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
EMS	Ethylmethylsulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Eprimiertes Sequenzmotiv
EtOH	Ethanol
GEF	Guanine-Nucleotid-Austauschfaktor
h	Stunden
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ISN	Intersegmentaler Nerv

Anhang

kb	Kilobasen
mAb	monoklonaler Antikörper
MetOH	Methanol
MG	Mittellinienglia
ML	Mittellinie
MP1	Midline Precursor 1, Mittellinien-Neuron
MP2	Midline Precursor 2
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
n.d.	nicht bestimmt
ORF	offenes Leseraster
pBST	Bluescript-Vektor (Stratagene)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,3% Triton
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PM	Plasmamembran
PNS	peripheres Nervensystem
PZ	P{ <i>rosy lacZ</i> }-Element (Hiromi & Mlodzik, 1992)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
SN	Segmentaler Nerv
<i>UAS</i>	<i>Upstream Activating Sequence</i>
ü.N.	über Nacht
VUM	Ventral Unpaired Median (Neurone der Mittellinie)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

I. Komplementationsanalysen

Durchgeführte Komplementationskreuzungen mit den Defizienzen des 3. Chromosoms und den beiden *schizo* EMS-Allelen. † = komplementiert nicht; v = komplementiert

Defizienzen	<i>schizo</i> ^{U112}	<i>schizo</i> ^{C1-028}
Df(3L) vin	v	v
Df(3L) fzME21	v	v
Df(3L) fzGF3b	v	v
Df(3L) ME107	†	†
Df(3L) Pc-MK	†	†
Df(3L) D-5rv6	v	v
Df(3L) Pc2q	v	v
Df(3L) 31A	v	v
Df(3R) ME15	v	v
Df(3R) 6-7	v	v
Df(3R) Tp110	v	v
Df(3R) Ser	v	v
Df(3R) D6	v	v
Df(3R) p712	v	v
Df(3R) pXT130	v	v
Df(3R) by10	v	v
Df(3R) by62	v	v
Df(3R) M-Kx-1	v	v
Df(3R) P115	v	v
Df(3R) C4	v	v

II. Komplementationsanalysen mit Defizienzen aus der Region

Durchgeführte Komplementationskreuzungen mit kleineren Defizienzen aus der Region 77-78 zur Ermittlung des *schizo*-Lokus. † = komplementiert nicht; v = komplementiert

Defizienz	<i>schizo</i> ^{U112}	<i>schizo</i> ^{CI-028}
Df(3L) Pc-12h	v	v
Df(3L) Pc-9a	†	†
Df(3L) Pc-MK	†	†
Df(3L) Pc-cp2	v	v
Df(3L) ME107	†	†
Df(3L) Pc-2q	v	v
Df(3L) ME24	†	†
Df(3L) ME14	†	†
Df(3L) D-5rv6	v	v
Df(3L) ME178	†	†
l(3) 78Aa ¹	v	v
l(3) 78Ab	v	v
l(3) 78Ac ¹	v	v
A464	v	v
B1338	v	v
Df(3L) ME915	v	v
Df(3L) Pc101	v	v
Df(3L) ME726	v	v
54691	v	v
B3068	v	v
Z389	v	v
T(3;4) 11d	†	†
T(2;3) ME21	†	†

III. Komplementationsanalysen mit den P-Insertionen

Die Daten aus der Komplementationsanalyse II. deuten darauf hin, daß sich *schizo* in der Region 78A befindet. † = komplementiert nicht; v = komplementiert

P-Elementinsertion	<i>schizo</i> ^{U112}	<i>schizo</i> ^{CI-028}
<i>l(3) 1722</i>	v	v
<i>l(3) 1500</i>	v	v
<i>l(3) 200</i>	v	v
<i>l(3) 204</i>	v	v
EP(3) 3403	v	v
EP(3) 3468	v	v
<i>l(3) 1490</i>	v	v
l(3) 6913	v	v
l(3) L4009	v	v
l(3) rK760	v	v
l(3) L7062	v	v
l(3) L5541	v	v
l(3) 3	†	†

IV. Komplementationsanalyse

	Df(3L)	Df(3L)	Df(3L)	Df(3L)	Ab(3L)	T(3;4)	T(2;3)	Df(3L)	Df(3L)	Df(3L)	Df(3L)
	ME107	Pc-MK	Pc-9a	ME14	ME178	11d	ME21	ME24	Pc-cp2	Pc-12h	Pc-2q
Df(3L) ME107											
Df(3L) Pc-MK	†										
Df(3L) Pc-9a	†	†									
Df(3L) ME14	n.d.	†	n.d.								
Ab(3L) ME178	v	n.d.	n.d.	†							
T(3;4) 11d	v	†	†	†	†						
T(2;3) ME21	†	†	v	†	†	v					
Df(3L) ME24	n.d.	n.d.	†	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
Df(3L) Pc-cp2		†		†		v	v	n.d.			
Df(3L) Pc-12h		†	v	v	v	n.d.	v	n.d.	n.d.		
Δ3443	v	†	†	n.d.	v	†	v	n.d.	n.d.	v	n.d.

V. Verwendete Oligonukleotide

P-Element-Primer

Primer-Name	Sequenz		Tm (°C)
Plac4	5' ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT 3'	5'Ende	78
Plac1	5' CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AA 3'	5'Ende	74
Pry1	5' CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT 3'	3'Ende	78
Pry2	5' CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T 3'	3'Ende	84
Pwht1	5' GTA ACG CTA ATC ACT CCG AAC AGG TCA CA 3'	5'Ende	86

Standard-Sequenzierungsprimer

Primer-Name	Sequenz
M13f	5' TGACCGGCAGCAAAAATG 3'
M13r	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'
T3	5' AATAACCCTCACTAAAGGG 3'
T7	5' GTAATACGACTATAGGGC 3'
KS	5' TCGAGGTCGACGGTATC 3'
SK	5' CGCTCTAGAACTAGTGGATC 3'

Primer zur Sequenzierung der cDNA

Primer-Name	Sequenz
ex1rev	AAAACGTTCAAGATTTATG
LP1f	AGCACACACGTCGCTTGCT
LP2f	GTTTTAGAGCGAGAGCGGA
LP3f	TTATGCCCGATGTCTGCGT
GH2f	CGAGAGCAATCATTTCCGGA
GH1f	GGCTATCACCATTTCGAAT
LPrev	CAGAAGAGCCTGGAGCGAA
ex2w2	AAAAATTCAATTCCTTGT
LPT7	TGGGCAAAGAATGATGCGC
LPpred	ATGTCCAGGTGTGACAACCA
LP-ex2rev	GGAGGCGTTGGCTGATCCT
LPpred2	CAGCCAACGCCTCCACCTG
LPrev2	GGCCGCGTGATCATAAATC
LPrev3	TTATGCCCGATGTCTGCGT
LPrev4	CTTCCTCGCAACCCTCTGA
Lpex2w	TTTGTGGTTGTCACACCTG
GHT7	CTATTTTCATCGCGCCTTCC
GHrev	GCATGATCACGCTGGTGGC
ex3ftest	GCCTTCCGTCACTACATGAT
ex3revtest	AGTCGTGCGGTGATCCATGGT
LPrev5	GCCGCTCAAATGCAGGCTG
LP-5'	AACAATAGTGCCGCCACCA
ex5rev2	CGCTAGATTTGGTTTCTTG
LPrev6	GCTCAGTTGCTTTGCCATG
3endf	TGCATCAGCGCGAGGTGTT
ex5rev	TCTCCGCATTGCCAGGTGCT
GHPM001-2	TGTACAATAGATGACTTAG
GHPM001	TCAAACGGGTATGGCAT

Primer zur Amplifizierung genomischer Sonden

Primer-Name	Sequenz	T_m (°C)
LP1f	5' AGCACACACGTCGCTTGCT 3'	60
LP1rev	3' TCCGCTCTCGCTCTAAAAC 5'	58
LP2f	5' GTTTTAGAGCGAGAGCGGA 3'	58
LP2rev	3' ACGCAGACATCGGGCATAA 5'	58
LP3f	5' TTATGCCCGATGTCTGCGT 3'	58
LP3rev	3' ATTCGAATGGTGATAGCCC 5'	56
LP4f	5' GGGCTATCACCATTCTGAAT 3'	56
LP4rev	3' CTCCTCGCAACCCTCTGA 5'	60
LP5f	5' TCAGAGGGTTGCGAGGAAG 3'	60
LP5rev	3' GACATTACGCTATTATTTTCG 5'	54
LP6f	5' CGAAATAATAGCGTAATGTC 3'	54
LP6rev	3' TTGCATAGAAGTCGCTATCTTT 5'	60
LP7f	5' AAAGATAGCGACTTCTATGCAA 3'	60
LP7rev	3' GAGTGGCCGCTCGTGTTAA 5'	60
LP8f	5' TTAACACGAGCGGCCACTC 3'	60
LP8rev	3' AACACCTCGCGCTGATGCA 5'	60

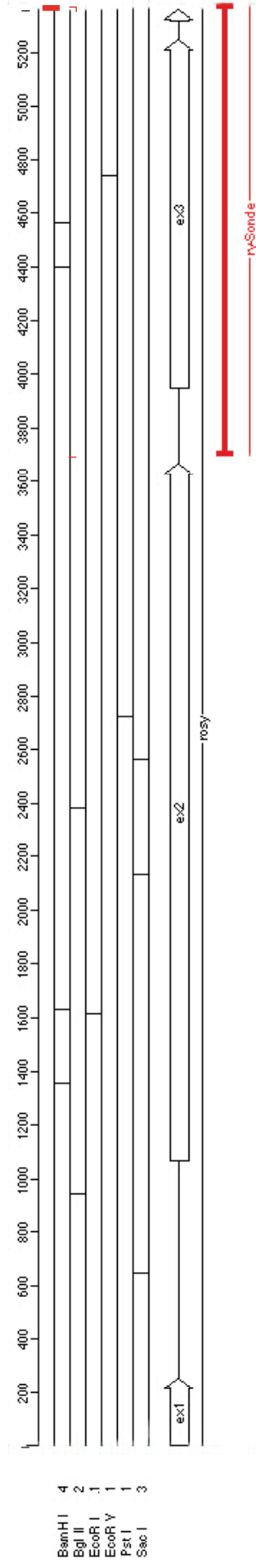
Primer zur Sequenzierung der EMS-Allele

Primer-Name	Sequenz	T _m (°C)
ex1rev1	TGGTTGTCACACCTGGACAT	60
LPpred	ATGTCCAGGTGTGACAACCA	
ex1rev	CATTTGGATGGGTTGGATG	56
LPpred2	CAGCCAACGCCTCCACCTG	64
ex2rev	ACATCACCCGGGAGAAAGT	58
ex2f	CCAATGCAAGTAGTGTTCTAA	58
GHrev	ATTCGAATGGTGATAGCCC	56
ex3f	CCTCCAAATACTTATCGGA	54
ex3rev	GTAGCAGACGTCCCTTATC	58
ex4f1	TAAACTGACTTTATCCAATCT	54
ex4rev1	TGTCTGCTGTTGTGCCGTAA	60
ex4f2	TTACGGCACAAACAGCAGACA	60
ex4rev2	TGTTGCTCGTGCTGCTGCT	60
ex4f3	AGCAGCAGCACGAGCAACA	60
ex4rev3	TCTCAATCGCCCGACAATG	58
ex5f	CATTGTCGGGCGATTGAGA	58
ex5rev2	CGCTAGATTTGGTTTCTTG	
ex5f2	CAAGAAACCAAATCTAGCG	54
ex5rev	TCTCCGCATTGCCAGGTGCT	64
ex5f3	AGCACCTGGCAATGCGGAGA	64
ex6f	CGTTCCAGTCCACTACAAC	58
ex6f2	CTAAGTCATCTATTGTACA	58
GHPM001	TCAAAACGGGTATGGCAT	
GHPM0012	TGTACAATAGATGACTTAG	58

Primer zur Erstellung der *rosy*-Sonde

Primer-Name	Sequenz	T _m (°C)
rosyf	5' CGGAACTCATATTTCAATTC 3'	54
rosyrev	5' TCTGGTTAGTGTGGGAATTT 3'	56

VI. *rosy*-Gen und amplifizierte *rosy*-Sonde:



VII. Sequenzen und Karten von *schizo*

Sequenzierungskarte der *schizo* cDNA LP01489



VIII. Etablierung von transgenen Fliegen

Etablierung von P[UAS-ARF-GEP₁₀₀]-Insertionen

Injizierte Embryonen	Geschlüpfte Larven	Geschlüpfte Fliegen	Transgene (F1)
430 (100%)	90 (21%)	56 (13%)	4 (0,9%)

Etablierung von P[UAS-ARF6]-Insertionen

Injizierte Embryonen	Geschlüpfte Larven	Geschlüpfte Fliegen	Transgene (F1)
405 (100%)	69 (17%)	50 (12,3%)	4 (0,9%)

IX. Karten von *schizo*

1. *schizo t1*
2. *schizo t2*
3. genomische Region von *schizo*

Aminosäuresequenz Peptidantikörper: YAPGAHSSSAINYPA

AGCACACACGTCGCTTGCTCGCTCGTTTTGTTGTTTTCCGTTTCGATTACACCTTTTCGAGTCGTCGTTGGCAGCGCTGCACGCGTCTCGGTCGCGGATCGTTTGTGTTTCAATATATATCAAAAATATATT 130
K H T R R L L A R F V V F P F D Y T F R S R R W Q R C T R L G R R S F V F Q Y I Q N I L

GTTTAATTAACGAGTTTGGCAAGCGAAAGAAAAACAAAAATGAATTTTAAATAAATCAATGAAAATTTGAAATGAGTGCTAAAACGCTGACTTTGAATTGTGACCGAAATAGAAAGTAATAAAC 260
F N . R S L A S E R K K Q K I E F L I N S M K I . N . V L K R . L . I V T E I E V I N

AAAAAGAATGTAGCCGCGCAGCGACTCTTGGAAATTCAAAACAAACCAAGATAAAATGGCAAAGAATGATGCGCAGCGCTGTAATAAATTAATAAGCCCAATCAACAACACAAACGAAACGACA 390
K K N V A A R R D S W N S K T K P K I K W Q R M M R R R S . I N . . A Q S T T O R N D

AGAAAACAAATCAATTTGCAATGAATAACCGAAAGTAACCAACCAACCAAAAGCGAACCAAGGGGAAATTCCAATAATAACAACAATAATAAAAAACACAATGTCATGACGACGGTGAAGCGGAAA 520
K K T N Q F A N E . P K V T N Q P K S E H K G E I P I I T T I I K N T I A . R R . R R K

GTAAGCCATTTGCCCCCTTTCACCCCGCAATCGCATGAAGAATACCACAACCAACAATGTCAGGTGTGACAACCAACAATCCCGCGCCAACAGCTGCGCGTTCGCGCGCCCTGTCTCTCCAC 650
ORF
. K P L P P F T P R I A . R I P Q T T M S R C D N H K S R R Q Q L P V P A P L S S S H

TCCAACTCGTCTCGTCCCGCTCGCAAGGACACCACCACCACCACCAGCTCCATTTCGAGCAACTCGGATCTGGGCGGCAGTGAGTCTTCTGCAATATTGCAGCGATAGCGAAAAGAGGCCAC 780
ORF
S N S S S S R S Q G H H H H H H H Q L H S S N S D L G G S E S F L Q Y C S D S E K R P

CACCGATTGTGGTGGTTGTGGCGATGGCAGGAGCCGGGTACGTGGGTGTGCGCACCGCAACGGCGCAGTCCCGTGTGTCAGTCTGTCCACCCGGCACAAGGAGACCCAGACGCACACTCGCACCA 910
ORF
P P I V V V V G D G R S R V R R V V R T A T R H V T V V S L S T R H K E T Q T H T S H H

TGTGACGGCGCTCAGCTTTCGCCAGAGAGCCTGGAGCGAAGTGGTTCCACCCAGTATGAGCTGGTGGAGCGCAACAGCCAGGATCAGCCAAACGCTCCACTGCACAGATAGCGGCAGTGTGGCGGC 1040
ORF
V T A V S F P Q K S L E R S G S T Q Y E L A G A Q Q P G S A N A S T C T D S G S V G G

TATGTTTACCTGCAGAATCACTACGCCCGCGCCACAGCTCTCAGCCGCCATCAACTACCTGCGCAACAGCATCCCCAGATGGTCTACCAATAACAGCAGTATCCACGTCGCATCAGCAGCAGC 1170
ORF
Y V Y L Q N H Y A P G A H S S S A A I N Y P A Q Q Q H P Q M V Y Q I Q Q Y P T C H Q Q Q

AACAGCAGCACCTCCAGCAGCAGCAGCTTTGCATCAGACCGCGCAGGTCACTACATGCAGGTGACGGCGACGGTGGTGGCCAGTATCATCACCATCACATGCTCCATGTCACGGGCATCATGCCCA 1300
ORF
Q Q Q H L Q Q Q Q H L H Q T G A G H Y M Q V T A T G G G Q Y H H H H M L H G H G H H A H

CCATCAGGTGGGGCGGTGGTATCGCCGGAGTGGTGTGGAACTGGCTGGGATCTGGAGCCACCAGCGTATCATGCAGCACCAGCAACAGCAGCAACAGCAAGATAATGCACAAGAACTCC 1430
ORF
H H G G A V V I A G S G V G T G L G S G A T S V I M Q H Q Q Q Q Q Q Q N M H K K N S

ATCCGAAACGGCGAGATGCTTCAAGCGAACGCGAGCTCAGTCGGCTACGAACTCTCAAGATCTGCTTGAGAAACAGATCGAGCTGTCGGAGCGCAAGTACGGCGGAGTCCGAGCCGTAACGCAG 1560
ORF
I R N G G D V L K R T R A Q S A Y E L S Q D L L E K Q I E L L E R K Y G G V R A R N A

Enzyme sites: Pvu II, EcoR I, Kas I, Nar I, Ssp I, Hae I, Pst I, Bal I, Hae I, Msc I, Nco I, Sty I, Sst I, Bgl II

Peptidantikörper

CGGTCACATATTCAGCGCGCCTTCGGTCACTACATGATGGTCAAGAAGTTCGCCCTCGATCAACGCAATGGCCAAAGCTGAGAAGCGCTAAGCCGGCGGATGGTGGTTACAGCCAGCAGTCTTGGATTGCG 1690

Bal I
Hae I
MscI
Nae I

ORF
A V T I Q R A F R H Y M M V K K F A S I T A M A K A E K R L S R R M V V T A S S L G L A

GGAGGAGGGTGCCTCCTCCTCGTCAGCCTACGGAAGTCCCGAATCTCAGCTCACCAGCAGCAACAGCAACAGCGGCAGCAGCAACAGCAGCCAGTGTCCACCATCATGGCGGGTCCGGCGGGA 1820

ORF
E E G A S S S S A Y G S A T E S Q L T E Q Q Q Q Q Q A Q Q Q Q Q P R V T I M A G P A G

GCAGCTTCCGGGCTTATCCCGGACGCCACTACGCGATCGCTTCCATCGGGAGCGAGCTCAGCTGGACTGCAGTCCCATACCGCGTAGTCAGTCAGGAGCCTTCCCGCCTCCATATCGAGCTCGA 1950

Pvu I Pst I Sst I

ORF
A A S P G L S R T P P T R S L S M R E R R Q L D C S P I P R S Q S G A S P A S I S S S

CAGTCAGCACATCGGCTCCTCGCTCACATCCACATGTTAATCTGCTGCACGCGGCAGAGCCACATTATTATAATGCTCAGGCAGTCCCGCAGGAGCTGCTTACTACACTAGTTACCATGGATCACCGCA 2080

Hae I Spe I Nco I Sty I

ORF
T V S T S A L A S H P H V N L L H A A E P H Y Y N A Q A L P Q G A A Y Y T S Y H G S P H

CGACTTGAGCTATGCCAGTTCCGGCGCACCTCGCTAAATGCCTCGTGGGTTAACACGAGCGGCCACTCCCGCACACGCCCTACTATTCCGGCGCCAGATCTATATCGGACCCAAAGGGCGGCAGCACC 2210

Hinc II Hpa I Bgl II Sty I

ORF
D L S Y A S S A D T S L N A S W V N T S G H S P H T P Y Y S A A Q I Y M R P K G G S T

ACGCCACGCCAGTTGCAGTGGCAGCAGGTTAGCGGAGCGGAGGAGTGGCAGTAGCAAGAAGTGCACCAGAGGTGCCAAACGCACAGTTCATTACGGCACACAGCAGACACGC 2340

ORF
T P T P S C S G S T G S G S G S G S G S S K K V P P E V P K R T S S I T A Q Q Q T Q

TTCTTTTGTCTGAGCGCCAGACACCGCCCTCCTTCGCTGCTAAGGACCAATGGCTGTGCAAAACCGCAGAGACCGAGTGTACCTCCGTCAGAGTTCGGGATTCGGATTCTAGTGTACCTCTGC 2470

Pst I Hae I

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

GGAACGCAATCTAAACAGCGATTTGGGCTCGGATCGCAGTAACTCACCACATACATGGAAACGAGGAAACAGCCCTAAATAGTTCCAGCAGTTCACACGCACTCGGCGGATTACGGGGTCCGGTGTCT 2600

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

GGTGGAGGAGTTGGAGTGGCTGGAGGAGCCGGCTTTATGCGCCTCAAATGCAGGCTGCCGTTCAGCAGCTACAGCGCAGGAGGAATGCCACCAGCGGATGACCATGCTATCTCCTCGCATACGAGTG 2730

Nae I

ORF
G G G V G V A G G A G V Y A A Q M Q A A V A A A T A A G G M P P A D D H A I S S H T S

CCGCTCAGTATGAGCAGCATGAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAATTCAGCGCGCAGTGCAGTCCCGGAGTGGCAGCAAAACTACAAGATGTCGGAGACGATACGCAAGCGCAGTATCGCGTTGG 2860

Pst I

ORF
A A Q Y E Q H E Q Q Q H E Q Q Q L Q A A A A A G V A Q N Y K M S E T I R K R Q Y R V G

Sec7

ACTCAATCTGTTCAACAAGAAGCCGAGAGGGCATCACCTATCTGATCAGCGGGGATTCCCTGAGAATACACCACAGGGCGTTCCTCGTTCCCTCATCACCCGTAAGGGTTGTCCCGGCAAATGATT 2990

ORF

Sec7

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

Nco I
↓
Sty I

Nae I
↓

Hae I
↓
Stu I

Sph I

GGCGAGTATCTGGAAATTTGCAGAACCAAGTTCAACATGGCCGCTCAGTTGCTTTGCCATGGAGCTGGACCTGTCCGGCCGGCAAGTGGATGTGGCTTTGCGAAAAGTTCCAGGCCTATTTCCGCATGC 3120

ORF

Sec7

G E Y L G N L Q N Q F N M A V L S C F A M E L D L S G R Q V D V A L R K F Q A Y F R M

Bgl III
↓

CTGGAGAGGCCAAAAGATTTGAGCGCCTCATGGAGATCTTTTACAGCGCTATTTGTAATGCAATGCGGACATTTGTCGGGGCATTGAGATCATCCGATACGATCTTCGTCTGGCTTTCCGCATCATCAT 3250

ORF

Sec7

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

Sph I
↓

GCTGAACACGGATCTGCACACCCAATCTAAAGCCAGAAGCTCGCATGCGCGTTCGAGACTTTTCAAGAATCTGCGGGCATCGACGACTGTACGACATTTGATTAAGGACATGCTGATGGGCATCTAT 3380

ORF

Sec7

L N T D L H T P N L K P E R R M R V E D F I K N L R G I D D C H D I D K D M L M G I Y

Hae I
↓

GACCGTGTCAAGTCCGACGAATTTAAGCCCGCAGCGACCATGTCACCTCAAGTGAAGGTACAGGCCACTATTTGGGCAAGAAACCAATCTAGCGCTGCCCATCGGCGTCTGTCTGCTATTGCC 3510

ORF

Sec7

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

Ssp I
↓

GACTGTACGAGATTCTGACGTGAACAAGAAGGAGCGACCTGGTGTGCATCAGCGCGAGGTGTTTCTGTTCAACGATCTGTGTCATTACCAAAATATTTAGCAAAAAGAACCTCCGTGACGTACAC 3640

ORF

PH

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

Bgl III
↓

ATTCGCAACAGTTTCCGCTATGCGGCACCGTTGTCACCCTTCTGGACATGCCAACTATCCGTTTTCGATTTCAGCTCTCCAGAAAGTGGATGGCAAGATCTTGATCACCTTCAACGCCCGCAACGAA 3770

ORF

PH

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

Pvu I
↓

CACGATCGTCAAGTTTCCGAGGATCTTAAAGACTCCATTAGCGAGATGGACGAGATGAGTTCGCTGCGCATTGAGGCCAACTGGAGCGCCAGAAGTCCGCGCAATCGAGCACCTGGCAATGCGG 3900

ORF

PH

H D R C K F A E D L K E S I S E M D E M E S L R I E A E L E R Q K S A R N R A P G N A

Not I
↓

Pst I
↓

AGAATCGTGACAGTGGCGTAGCCGATGTGGAGTCTGCCATGCCGTATCAGCAAGGATCACAGCATCTGGCGAGCAGGCTCAAACCTGCGCGATAACTCGCAGCAGTGAAGCGCAGTGGCTGAG 4030

ORF

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

Not I
↓

Pst I
↓

CAACAGCCTTCTCGACATGCAGGACAGTTTGGCAATGAGAACTCAACGCTGCGCAGGTTGGCTCCCTGGACAGCGCATGAGCATCTCGTTCCAGTCCACTACAACATCCAGCGCTTCGAGGGAA 4160

ORF

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

Not I
↓

Pst I
↓

AATGCCGCTGCCATTTGCGGCGCAGCAAATGACGCTGACGACGCAAGATGCGATTTAACATGCCGCCAACGGCAGGATTGCCACGCCAGCAATGTGTATGCGACTCCGGGAATGCAGGCGTATACCC 4290

ORF

N A A A I A A A A N A A A A A K M R F N M P P T A A I A T P S N V Y A A P G M Q A Y T

ATGCCAACTTTGTGCAGCAGTCACAGGCGCCTACATGTTGCAGCAACAGCAAATGCTCCAGCAGCAGGCACAAATGCAAGCTCAGGCTCAGGCTCAAGCCCAAGCTCAGGCCCAAGCTCAAGCCAGGC 4420

-----ORF-----
H A N F V Q Q S Q A A Y M L Q Q Q Q M L Q Q Q A Q M Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A

Sal I
Hinc II

TCAGGCGCAGGCGCAGGCGCAGCGCTTACTGGCCGAATACCGGGACGGAGCGAAAGGCTTCGCGGACGGATGAGAACGGACGGTCGACGGAGGCTTAAGTCATCTATTGTACATTTTAGTTATTGAGC 4550

-----ORF----->
Q A Q A Q A Q P L T G R I P G R E R K A S R T D E N G R S T E V . V I Y C T F . L L S

EcoR I

AAAGCGATAATTATAATATCTATATAGCATATTGAATGAAATATCTGTATAATCCGAATCGAAACGACCCGAACGCCATTTTCTTCAACACCTAACCCACACACAGCGTACGAGTATATAGTGAATCTTT 4680
K A I I I I S I . H I E . N I C I I R I E T T R T P F S S T P N P H T A Y E Y I V N S

Ssp I

AATGTTCTCGTTCCTGCTAATAATTAATGTAATAAATAAACATTGTGCTGTTTACACTATCTACACACTAAAATAAGTTTCTAAAACCTATTGTATATACATCAGCATACTATAATACACCCACA 4810
. C S F V L C . Y . C K . I K H L S V L H Y L H T K I S F . N Y L Y I H Q H T I I H P Q

Nde I
Nsi I

ATCTATGAAAATTATCTCTAAATATGCATATGTATTATGTATAACTCTAATCCTCCAGACACTGAAACACCAATTTACCCCTGGGCAACCTTCTATGCCCATACCCGTTTTGATCTACCCCTCCC 4940
S M K I I L . I C I C I I V . L . S S P D T . N T N L P L G N L L C P Y P F . S T P P

CTTACGAATTACAAAAGCGATTGGCGAAAGTAGTTTCATTAGCATATACTAAAACCTATATCCCGATAAGTGC GCGCTATGTATATATATATTTTGTTTACCCCTACATTTCCTCTGTAACTAAAAG 5070
L T N Y K S D W R K . F H . H I L K T I S R . V R A M Y I I Y F V Y P T F S L C N . K

Ssp I Dra I

Ssp I

TGAAGTTCGTGTATACCGCGTGTGTGTATATACCCGTAATATTAATTTAAAAGCATTAGCTATAATTATTCATATTTTATAGAGCCAAAACCTACCCAAAACCTAAAATATTAATACGAGTATAACAA 5200
V K F V Y T A C V C I Y P E Y . F K S I . L . L F I F I E P K L P K T . N I K Y E Y N K

ACACGAAGTATGAAAACAAAACAATATGTATATGAAAAGCAAAAGACTTAAAAATTTCAATAAATGAAAAGAAAATAATACCAA 5286
H E V Y E N K T I C I . K S K R L K N F N K . K E I I P

Sac II | Not I | Sac I | EcoR I |

ATTTGGACTCCCGCGGTGGCGCGCGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGATCAGGCCAAATCGGCCGAGCTCGAATTCGTGAGAGCGGACTGTTTCCAAACGTCGAACGACGAGTGC

Y W T P A V A A A . L R I A Y I I R S Y G S G Q I G R A R I R R E R T V S K R R T T S A

Nru I |

GTCGTGTTTTCGTGCGCGTGAATTGAAAATCCGTAATTCGAGAATATTCGTAATCCCCCTCCGATCCGCACCAACTGTGCTCGCGATTGGAAGTCTGGCTCTGAAGTATAATATACGAAGTTCAT

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

TCAATTACAATACGAGTGAAGTTTCAACTCGCAGCAAGCTGCATTTTCAGTTCCTTATTTGTGAGATTCAAAGTGGTTCGCTGTTTCGCTGTTTATCACCTCTCCACCACCTTCCCTCATTCGCGGGA

S I T I R V K F Q L A A S C I F S S Y C E I Q S G S A C F A V L S P S P P P S L I R A

Bal I? | Cla I |

GTGCGTGTGCGTGGCGGGCTATAATGTTTGGCCMCAAAAGCACATCGATTAGGAGTGCAGCCGATCCCGCTAAGGTTATAAACAACATGTCGAGGCCGATCGAAGAATCTATCCAGAACTCG

S A C A W R G Y N V L A ? K A H R L G V Q P I P A K V I N K T C P R P I . R I Y P R T R

Xma I | Apa I | Sma I |

GATGGCACCAGGAATTGCTGCTGCATCAGACCACGAGTCCCTGCTGATGGCCAGCTCCATAATGTTTGTGGAAACCAAGGGAAGGGCCCGGGCGGTTCCGCTGGGGGTGTCGCCCACTGGACCCG

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

Sph I |

TTTCTGCCCTGCCCTCTCCATCAACAATGCCCATCACCATGTCATGCGATGCCATACAATGTGGACGAGCTGCTCCGGGAGAACATGCCCTGCACGCCAAGATCAAGAGTTGAGTCTGGAACG

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

Pvu I | Sac I |

CGATCGCCTGCTCTGTGAAGTGTCCAATTCGCACATGGAGCTGGACATGTCGGAGCTCAAGCGACTGCCCGTGTGATCTCGATGATAATTTCCCAAGAGCCTGGAGCGAAGTGGTTCACCCAGTATGA

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

ORF

Pst I | Kas I | Nar I |

GCTGGCTGGAGCGCAACAGCCAGGATCAGCCACCGCTCCACCTGCACAGATAGCGGCAGTGTGGCGGCTATGTTTAACTGCAGAATCACTACGCCCGCGGCCACAGCTCCTCAGCCGCCATCAAC

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

TACCTGGCAACAGCATCCCGAGTGGTCTACCAAAATACAGCAGTATCCACGTCGCATCAGCAGCAGCAACAGCAGCACCTCCAGCAGCAGCAGCAITTTGCATCAGACCGCGCAGGTCCTACATGC

Y P A Q Q H P Q M V Y Q I Q Q Y P T C H Q Q Q Q Q Q H L Q Q Q Q H L H Q T G A G H Y M

Bal I | Nco I | Sty I | BstX I | Xho II |

AGGTGACGGCGACGGTGGTGGCCAGTATCATCACCATCACATGCTCCATGGTCACGGGCATCATGCCACCATCAGGTGGGGGGTGGTTCATCGCCGGGAGTGGTGTGGGAACCTGGCTGGGATCTGG

Q V T A T G G G Q Y H H H H M L H G H G H H A H H H G G A V V I A G S G V G T G L G S G

Sac I |

AGCCACCAGCGTATCATGCAGCACCAGCAACAGCAGCAACAGCAACAGCAATATGCACAAGAAGAACTCCATCCGGAAACGGCGGAGATGTCCTCAAGCGAACGCGAGCTCAGTCGGGTACGAACTCTCA

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

ORF

Bgl II
Xho II

CAAGATCTGCTTTGAGAAAAGAGATCGAGCTGCTGGAGCGCAAGTACGGCGGAGTGCAGAGCCCGTAAACGACAGCGGTCACTATTTCAGCGCGCCTTCCGTCACATACATGATGGTCAAGAAGTTCCGCTCGATCA

1560

ORF

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

Bal II

CGGCAATGGCCAAAGCTGAGAAGCGTCTAAGCCGGCGGATGGTGGTTACAGCCAGCAGTCTTGGATTGGCGGAGGAGGGTGCCTCTCTCTGTCAGCCTACGGAAGTGCCACGGAATCTCAGCTCACCGA

1690

ORF

T A M A K A E K R L S R R M V V T A S S L G L A E E G A S S S S A Y G S A T E S Q L T E

Pvu II

CGCAGCAACAGCAACACAGGCGCAGCAGCAACAGCAGCCACGTGTCACCATCATGGCGGGTCCGCGGGAGCAGCTTCTCCGGCTTATCCCGGACGCCACCTACGCATCGCTTTCATCGGGGAGCGA

1820

ORF

Q Q Q Q Q Q A Q Q Q Q Q P R V T I M A G P A G A A S P G L S R T P P T R S L S M R E R

Pvu II Pst II Sac II

CGTCAGCTGGACTGCAGTCCCATACCGGCTAGTCAGTCAGGTGCCTCTCCCGCTCCATATGAGCTCGACAGTCAGCACATGGCTCTGGCCTCACATCCACATGTTAATCTGCTGCACGGGCGAGGC

1950

ORF

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

Spe II Nco II Sty II Hinc II Hpa II

CACATTATTATAATGCTCAGGCACTGCCCGAGGGAGCTGCTTACTACACTAGTTACCATGGATCACCGCACGACTTGAGCTATGCGAGTTGCGGCGACACCTCGCTAAATGCCTCGTGGGTTAACACGAG

2080

ORF

P H Y Y N A Q A L P Q G A A Y Y T S Y H G S P H D L S Y A S S A D T S L N A S W V N T S

Bgl II Xho II Sty II

CGGCCACTCCCCGCACAGCCCTACTATTTCGGCGGCCAGATCTATATGCGACCCAAAGGGCGGCAGCACCCACGCCACGCCCGCTTTCAGTGGCAGCACAGGTAGCGGACCGGAGCGGGAGTGGC

2210

ORF

G H S P H T P Y Y S A A Q I Y M R P K G G S T T P T P S C S G S T G S G S G G S G S G

Pst II

AGTAGCAAGAAGGTGCCACCAGAGGTGCCAAACGACACAGTTCATTTACGGCACAACAGCAGACACAGCTTCTTTTGTCTGACGCGCCAGACACCGCCGCTCTCTCGCTGCTAAGGACCAATGGCCTGT

2340

ORF

S S K K V P P E V P K R T S S I T A Q Q Q T Q L L L L Q R Q T P P P P S L L R T N G L

BstX II

GCAAAACCGCCGAGAACGGCAGTCTGACCTCCGTGCAGAGTCCGGATCGGATCTAGTGTACCTCTGCGGAACGCAATCTAACAGCGATTGGGCTCGGATGCAGTAACTCACACATACATGGAA

2470

ORF

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

ACGAGGAACAGCCCTAAATAGTTCCAGCAGTTCACAGCACTCGGCGGATTCAGCGGTGCGGTGTCGGTGGAGGAGTTGGAGTGGCTGGAGGAGCCGGGTTTATGCCGCTCAAATGCAGGCTGCC

2600

ORF

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

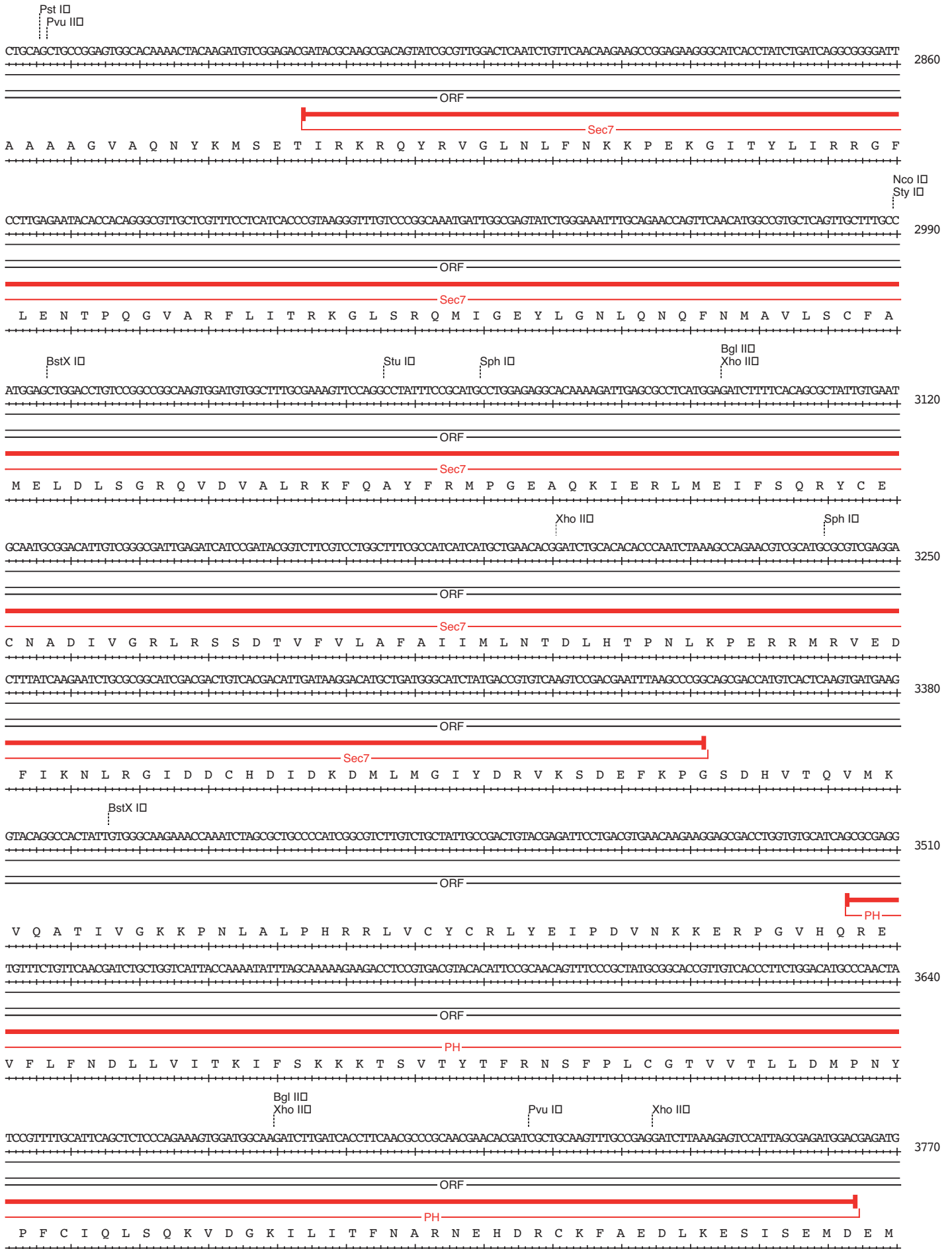
Pvu II

GTTCAGCAGCTACAGCGGCAGGAGGAATGCCACCAGCGGATGACCATGCTATCTCTCCGATACGAGTGCCTCAGTATGAGCAGCATGAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAATTCAGGGCGGCAG

2730

ORF

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



GAGTCGCTGCGCAATTGAGGCGAACTGGAGCGCCAGAAGTCGGCGCGCAATCGAGCACCTGGCAATGCGGAGAATCGTGACAGTGGCGTAGCCGATGTGGAGGTCTGCCCATGCCGTATCAGCAAGGAT

3900

ORF

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

Pvu II

CACAAGCATCTGGCGAGCAGGCTCCAAACTCTGCCGATAACTCGCAGCAGCTGAAGCGCAGTGGCTGAGCAACAGCCTTCTCGACATGCACGAGCAGTGTGGCAATGAGAAACCTCAACGTCGTGGCAG

4030

ORF

S Q A S G E Q A P N S A D N S Q Q L K R S A L S N S L L D M H E Q C G N E K P Q R R G S

Not I

Pvu II Pst I

CGTGGCTCCCTGGACAGCGCATGAGCATCTCGTTCAGTCCACTACAACATCCAGCGCTTCGAGGGAAAATGCCGCTGCCAATGGCGCCGAGCAAAATGCAGTCGACAGCCAAAGATGCGAATTTAAC

4160

ORF

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

ATGCCGCCAACGGCAGCGAATTGCCACGCCAGCAATGTGTATGCAGCTCCGGGAATGCAGGCGTATACCCATGCCAACTTTGTGCAGCAGTCACAGGCGCCTACATGTTCAGCAACAGCAAAATGCTCC

4290

ORF

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

AGCAGCAGGCACAAATGCAAGCTCAGGCTCAGGCTCAAGCCCAAGCTCAGGCCAAGCTCAAGCCAGGCTCAGGCGCAGGCGCAGGCGCAGCCGCTTACTGGCCGATACCGGGACGCGAGCGAAAGGC

4420

ORF

Q Q Q A Q M Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q A Q P L T G R I P G R E R K A

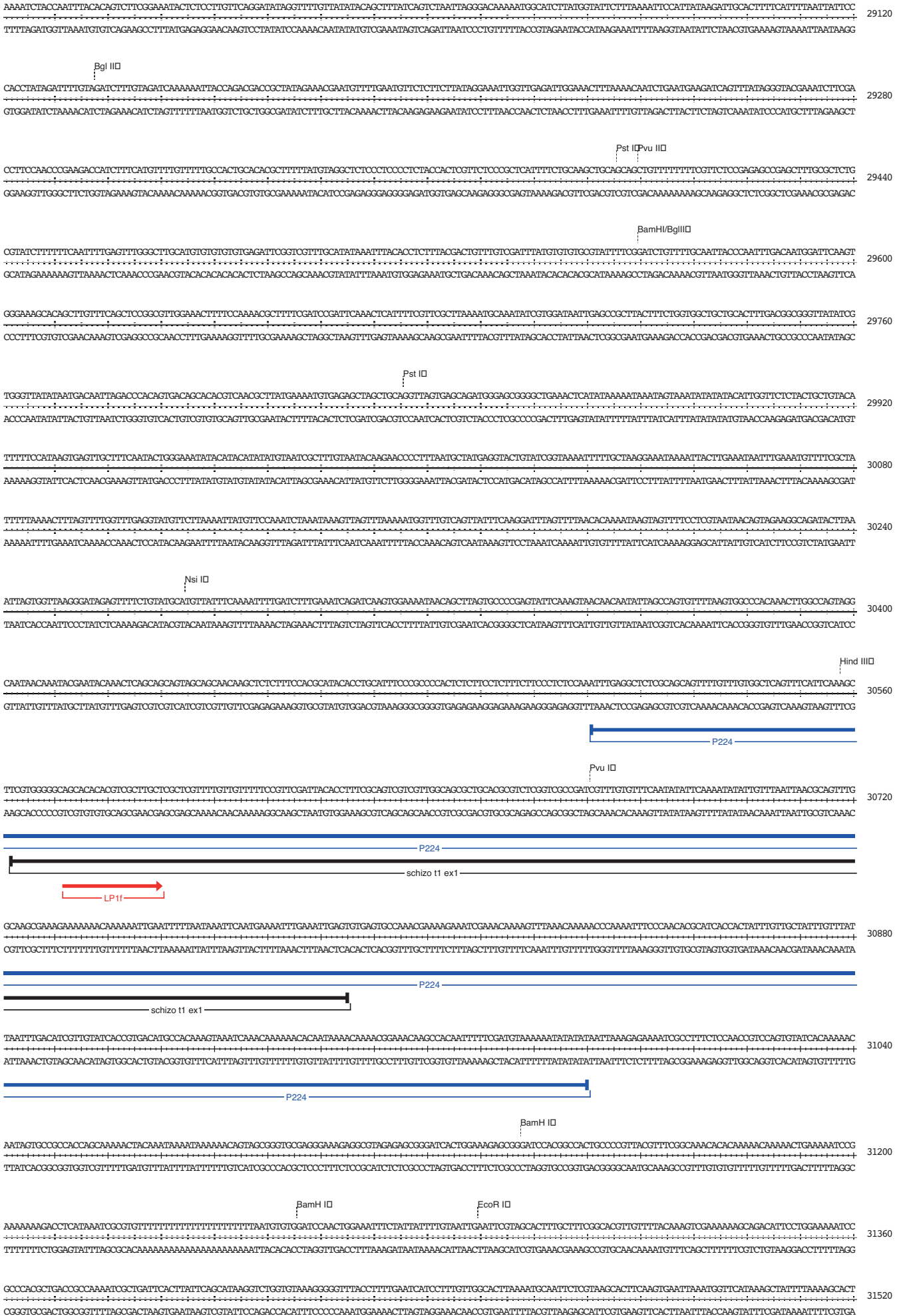
Sal I
Hinc II

TTCGCGAOCGATGAGAACGGACGGTCGACGGAGGICTAAGT

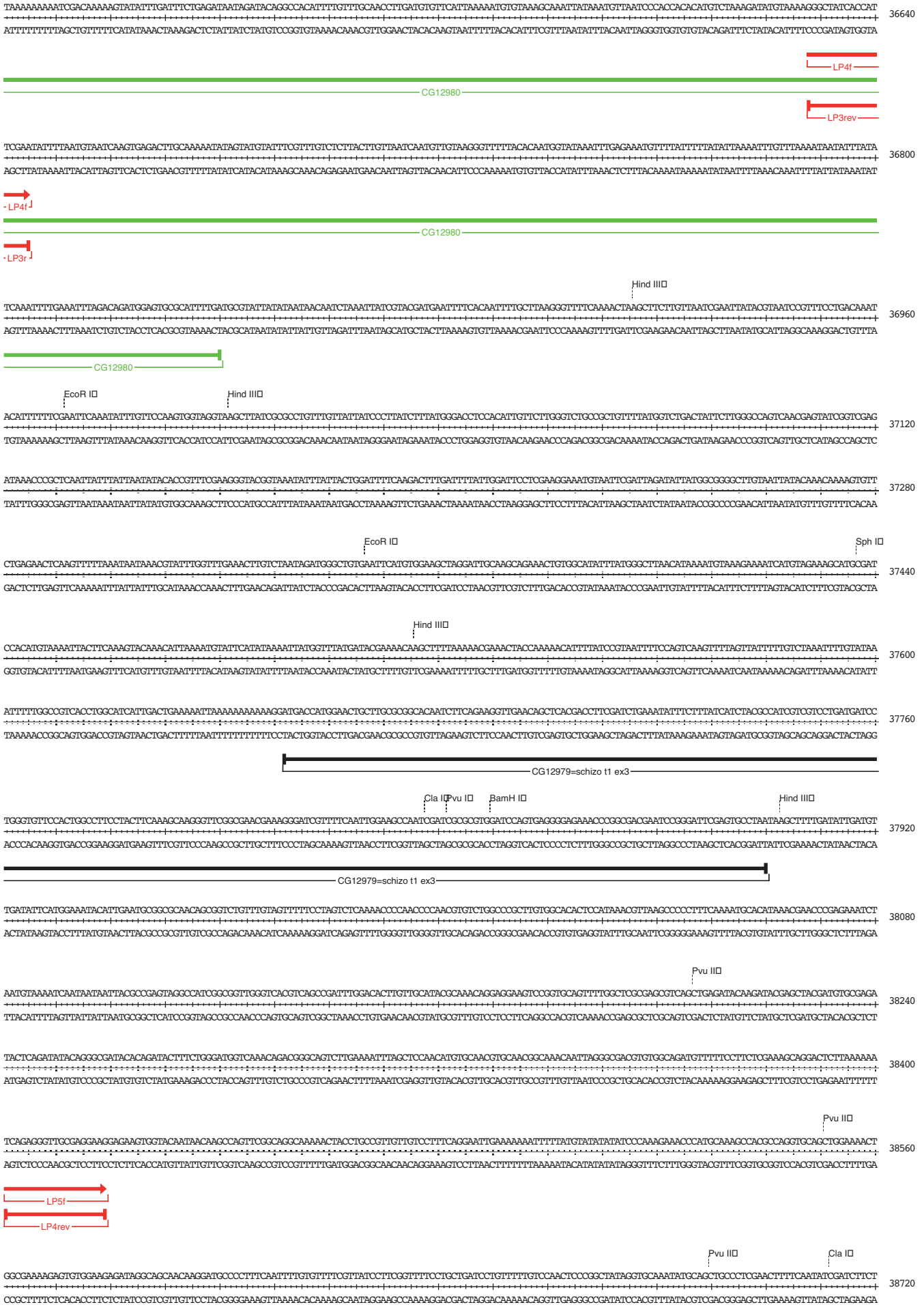
4462

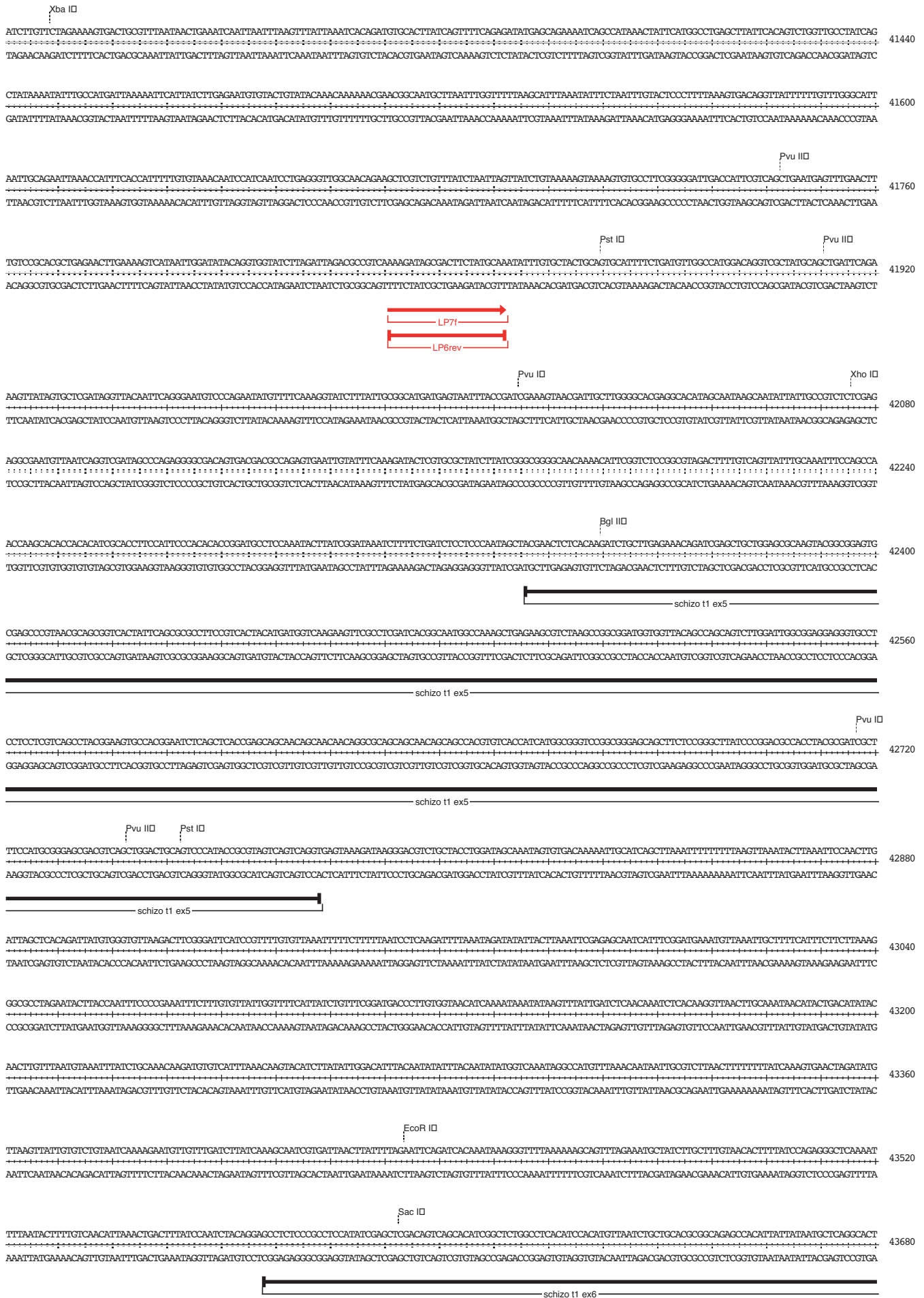
ORF

S R T D E N G R S T E V . V










```
ATGCGGCAATGTGACAGTGGCTGACCGAATGTGGAGTCTGCCAATGCCGTAATCAGCAAGGATCAACAGCATCTGGGAGCAGGCTCAAACTCTGCCGTAACCTGGAGCGCTGAAGCGCAGTGGCTGAGCAACAGCCCTCTGGACATGCAO 45760
TAOGCTCTTAGCAGTGTCAOCCATGGCTTACAOCTCAGAGGGTAAOCCGCAATGTTCTAGTGTCTGTAGACCGCTGCTGGAGGTTTGAGACGGCTATTGAGCGTGTGACTTGGCGTCAOGGACTGTGTGCGGAAGAGCTGTAGTGTCT
schizo t1 ex 7
GCAGTGTGAGTTAOCTCAITATATGTAGCAAAAACGCTTAGAGCTTAAGTTCAAATGTGATTTTTAAATTAGTTPAAGAGCATGATTTGTTTAGTAGTGTCTAAAGTAGTGTCTTAGTATGATTAAGAAATATGTAGACTTTACTGACTGGTTTTGTATC 45920
CGTCACACTCAAATGGAGTAATATACATCGTTTTTGGAACTCAGAATTCAGATTTACACTAAAATTAATCAATTTCTGTACATAACAATCATCAACGATTTATCAACGAATCATTAATTTCTTATACATCTGAAATGACTGACAAAAACATAG
ACCTTCAGTTGGCAATGAGAACTCAAGCTGGTGGCAGCGTTGGCTCCCTGGACAGCGCATGAGCAATCTGGTCCAGTCCACTACAACATCCAGCGCTTGGAGGAAATGGCGCTGOCATTTGGCGCCAGCAAAATGCACTGCAGCAGCCAAAGAT 46080
TGAAGGTCACAOCTTACTCTTTGGAGTTCAGCACCGTGCACACCAGGGCACTGTCCGCTACTGTGAGACAAAGTCAAGTGTATTTAGTGTGGCGAAGCTCCCTTTTACGGCGAGCGTAACCCCGCGCTGTTTACGTCGACGCTGCTGGTCTTA
schizo t1 ex 8
GOGATTTAACATGCCGCCAAGCAGAGATTTGCCAGCCAGCAATGTGTATGACAGCTCCGGAAATGACAGGCTATACCATGCAACTTTTGTGACGACTCACAGGCGCGCTACATGTGTCCAGCAACAGCAAAATGCTCCAGCAGCCAAATGCAA 46240
CGCTAAATGTAGCGCGTGGCTGGCTGCTAACCGTGGGCTGTGTACACATACGTCAGGCGCTTACGTCGCGCATGTGGTGTGAACAACGCTGCTGAGTGTGGCGGATGTACAAGCTGTGTGTGTGTGAGGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
schizo t1 ex 8
GCTCAGGCTCAGGCTCAAGCCAGCTCAGGCCAGCTCAAGCCAGGCTCAGGCCAGGCGCAGGCGCAGGCGCAGGCGCTTACTGTGCGAATAAGGGACGCGAGCGAAGGCTTGGGAGCGATGAGAACGGAGGTCGACCGAGGCTTAAGTCACTTAT 46400
CGAGTCGAGTCGAGTTGGGTTGAGTCCGGTTGAGTCCGGTTGAGTCCGGTCCGAGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCT
schizo t1 ex 8
GTACATTTTAGTTATTTAGCAAAAGCATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 46560
CATGTAATAAATAAATACTGTTTCGCTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
Nsi ID
CGTCTCTGCTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 46720
GCAGGACGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GTATACTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 46880
CATATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
TGOGGCTATGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47040
AOGGCGATCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
AACCTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47200
TTGGATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
AGGGCACGAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47360
TCCCCTGCTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
schizo t1 ex 8
CCTGTGCAAAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47520
GGAACATGTTTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
schizo t1 ex 8
ATAGTGGTGTGTTGATTTTTTACATAAATCGAATGTCTTAAACAGAACCGCTTGGCGTGTCTCTCTGGTGAAGCGGAAATCGAACTGGCATGTGAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47680
TATCAACAACAACCTAAAATGATTTTAGCCTAACGAAITGTCTTGGCGAACCCGACAGAGACAATCTTTTGGCTTATGCTTGAACGCTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
Xba I Bgl I
GATAAAACCTAAGAAAGATACATAAAATTTGCTGCTAATGCTGAATGAGAAATCAAATTTGAATAAATACAAAATTTGTTGCCAAATGGGAGCGTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47840
CTAATTTGGATTTCTTTCTAATGATTTTAAOAGATGACAGCTTAACTCTTTAGTTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
Xba I
AGCTCCGAAAACCCACAGCGATGACCTCTGTGTGGGCGGAGGTTGATGCTTTTATCTGGTCTAGAACATTCAAAATCGTGCACACGGATGCAATTTGGTCTCCGCTGCTGGCTGGTGTGTTCTGCTGCTTCTCTCCGCGTATTTTGCACCGCTGCTC 48000
TGGAGGCTTTTGGGTTGCTACTGAGACAACCCCGCTCACTACGAAAATGAGAACATCTGGTAAAGTTTTAGCCAGTGTGCTAGCAACCGAGGAGCGGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAG
BamHI/BglIII
CGCGCGCGCTGCTGCCATGTTGAGTTCCACAGGTTGTGATGCTGTGTAGGCTCACACCTGAAAGATCTTTCTGCGCCGCAAGGACGTAAGGTTAAAGGCAAGTGTGTCAGACTGGGAAAGTTATATAGCTTCTCCGCGCGTTGGCTAGCCAG 48160
GCGCGCGGCGAGCGAGTCAACTCAAGTGTGTCACAGCTACACAACCTCGAGTGTGGACTTCTAGAAAGAGCGGCGTTCCTGCATTTCAAATTTCTGTTTCAGCCAGTCTGACCTTTCAAATATATCGAAGCGGCGCAACCGATCGCTGCT
```

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. Christian Klämbt am Institut für Neurobiologie der WWU Münster durchgeführt. Ich möchte Christian für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken. Bei Prof. Dr. Wilfried Janning bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön an das Klämbt-Lab, wo ich mich gut aufgehoben gefühlt habe - auch wenn mich einige mit scharfen Essen vergiften (macht nichts, Gundi) oder mich mit Gummibändern abschießen wollten (warum mußte ich auch zwischen Gundi und Jan sitzen?). Ingrid Bunse möchte ich für die vielen lustigen Stunden danken, und natürlich auch für die unzähligen Sequenzierungen. Bei Karin Krukkert bedanke ich mich für die netten Mittagspausen und die praktische Hilfe. Danke auch an Dr. Uwe Lammel für die konstruktiven Anregungen.

Vielen Dank an Sven Bogdan, Gundula-Charlotte Edenfeld, Monika Fröhlich, Steffi Gögel, Ewald Grosse-Wilde, Jens Hillebrandt, Jörn Hülsmeier, Dirk Langehans, Jan Pielage, Georg Steffes, Tobias Stork, Mareike Strunk, Yvonne Ribbers und Adriane Zierau.

Danke auch an die Ehemaligen: Dr. Sebastian Granderath, Dr. Thomas Hummel und Dr. Kristina Schimmelpfeng.

Meinen Eltern bin ich für den steten Rückhalt dankbar. Und bei Robert Gibbels bedanke ich mich für die viele Unterstützung besonders am Ende dieser Arbeit.