

Biologie

**Die Funktion von  $\alpha$ -Spectrin und assoziierten Proteinen in der Entwicklung der  
Mittellinienglia von *Drosophila melanogaster***

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

vorgelegt von  
**Wilm Tobias Stork**  
aus Bünde

-2005-

Dekan: Prof. Dr. N. Sachser

Erster Gutachter: Prof. Dr. C. Klämbt

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Janning

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2005

Tag der Promotion: 16.12.2005

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Entwicklung des embryonalen Nervensystems von <i>Drosophila</i> .....	1
1.1.1 Spezifizierung des Neuroektoderms .....	1
1.1.2 Proneurale Cluster und Selektion eines Neuroblasten.....	2
1.1.3 Delamination der Neuroblasten.....	3
1.1.4 Axonale Wegfindung .....	3
1.2 Die Entwicklung der Gliazellen .....	5
1.2.1 Entwicklung und Funktion der Mittellinienglia .....	5
1.2.1.1 Die Entwicklung der Mittellinie .....	5
1.2.1.2 Die Entwicklung und Morphologie der Mittellinienglia.....	6
1.2.1.3 Die Bildung der Konnektive und die Trennung der Kommissuren ..	7
1.2.1.4 Überleben der Mittellinienglia .....	8
1.2.1.5 Weitere Gene die zu einer Fusion der Kommissuren führen .....	9
1.2.1.6 Analyse von <i>klötzchen</i> .....	10
1.2.1.7 Epitheliale Zellpolarität .....	11
1.2.1.8 Das Spectrin Cytoskelett .....	13
1.2.2 Entwicklung und Funktion der lateralen Glia.....	15
1.2.2.1 Kontrolle der Entwicklung der lateralen Glia durch <i>gcm</i> .....	15
1.2.2.2 Klassifizierung von Gliazellen des embryonalen ZNS .....	16
1.2.2.3 Funktion und terminale Differenzierung von Gliazellen .....	16
1.2.2.4 Septate Junctions und die Blut-Hirn-Schranke .....	17
1.3 Zielsetzung .....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Material .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen .....	19
2.1.3 Vektoren .....	25
2.1.4 Bakterienstämme .....	25
2.1.5 Primäre Antikörper .....	25
2.1.6 Sekundäre Antikörper .....	26
2.1.7 Verwendete Fliegenstämme .....	27
2.1.7.1 Balancer- und Wildtypstämme.....	27
2.1.7.2 Verwendete Mutationen, Defizienzen und Enhancer trap Linien .....	28
2.1.7.3 Verwendete FRT Chromosomen.....	30
2.1.7.4 Weitere Stämme zur Generierung von mitotischen Klonen .....	31
2.1.7.5 Rettungskonstrukte und GFP Linien.....	31
2.1.7.6 GAL4 Treiberlinien.....	32
2.1.7.7 UAS Effektorlinien .....	32

## Inhaltsverzeichnis

2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Genetische Methoden .....	33
2.2.1.1 Sammeln von Embryonen .....	33
2.2.1.2 Keimbahntransformation.....	33
2.2.1.2.2 Injektion der Embryonen.....	34
2.2.1.2.3 Selektion transgener Fliegen.....	34
2.2.1.3 Generierung von somatischen Klonen mittels FRT/FLP Technik.....	35
2.2.1.3.1 Generierung von FRT 80B Rekombinanten .....	35
2.2.1.3.2 Generierung von mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe mittels <i>eyFLP</i> .....	35
2.2.1.3.3 Generierung von mutanten Klonen mittels <i>hsFLP</i> .....	35
2.2.1.4 Zellstress Experimente .....	36
2.2.1.4.1 Kältestress für Embryonen .....	36
2.2.1.4.2 Kältestress in Larven und Puppen.....	36
2.2.1.4.3 Hitzeschocks in Embryonen .....	37
2.2.1.4.4 UV-Stress Embryonen.....	37
2.2.1.5 EMS Mutagenese .....	37
2.2.2 Histologische Methoden.....	38
2.2.2.1 Antikörperfärbungen .....	38
2.2.2.1.1 <i>whole mount</i> Antikörperfärbung von Embryonen.....	38
2.2.2.1.2 Antikörperfärbung an L3 Imaginalscheiben .....	39
2.2.2.1.3 Antikörperfärbung an Ovarien .....	39
2.2.2.2 <i>in-situ</i> Hybridisierung an L3 Imaginalscheiben .....	39
2.2.2.3.1 Alkalische Phosphatase (AP) Färbung.....	40
2.2.2.3.2 Meerrettichperoxidase (HRP) Färbung.....	41
2.2.2.4 Präabsorption des anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörpers.....	41
2.2.2.5 Bestimmung der Hämocytenanzahl in L3 Larven .....	41
2.2.2.6 BrdU Markierung .....	42
2.2.2.7 Acridin Orange Färbung .....	42
2.2.2.8 Injektion $\text{CuSO}_4$ .....	42
2.2.2.9 <i>in vivo</i> Zeitrafferaufnahmen .....	42
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	43
2.2.3.1 Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde .....	43
2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen ( <i>Escherichia coli</i> XL-1 blue oder JM109).....	43
2.2.3.3 Bakterientransformation (Elektrotransformation) .....	44
2.2.3.4 DNA Restriktionen .....	44
2.2.3.5 Gelelektrophorese .....	44

## Inhaltsverzeichnis

2.2.3.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel.....	45
2.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen .....	45
2.2.3.8 Ligation von DNA Fragmenten .....	45
2.2.3.9 Mini-Präparation von Plasmid DNA .....	45
2.2.3.10 Midi-Präparation von Plasmid DNA .....	46
2.2.3.11 PCR.....	46
2.2.3.12 Sequenzierung .....	47
2.2.3.13 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen .....	47
2.2.3.14 Restriktion genomischer DNA für Southern-Blot Analysen.....	47
2.2.3.15 Southern-Transfer von DNA auf einen Nylonfilter.....	47
2.2.3.16 Fluorescein-Markierung von DNA-Sonden .....	48
2.2.3.17 Hybridisierung und Nachweisreaktion (Southern Blot) .....	48
2.2.3.18 Sequenzierung von Mutanten.....	49
2.2.3.19 Klonierung des UAS $\alpha$ -spectrin Konstruktes .....	49
2.2.3.20 Klonierung des MT-EGFP Konstruktes.....	49
2.2.4 Biochemische Methoden.....	51
2.2.4.1 Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten .....	51
2.2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	51
2.2.4.3 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen.....	51
2.2.5 Zellkultur .....	52
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
3.1 Was ist <i>klötzchen</i> ? .....	53
3.1.1.1 EMS Mutagenese .....	56
3.1.1.2 Screen über die <i>klötzchen</i> P-Elemente und $\alpha$ -spectrin <sup>rg41</sup> .....	57
3.1.1.3 Komplementationsgruppe <i>nny</i> .....	61
3.1.1.4 <i>CG32315</i> kodiert für Discs lost .....	64
3.1.1.5 Die <i>discs lost</i> Mutanten <i>dre-1</i> und <i>N-1</i> tragen vorzeitige Stopp Codons im <i>CG32315</i> ORF .....	66
3.1.1.6 Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse .....	67
3.1.2 Analyse von <i>discs lost</i> .....	68
3.1.2.1 Das Discs lost Protein .....	68
3.1.2.2 Die mRNA Expression von <i>discs lost</i> .....	68
3.1.2.3 Die Proteinlokalisierung von Discs lost .....	69
3.1.2.4 <i>discs lost</i> RNAi .....	70
3.1.2.5 Klassifizierung der <i>discs lost</i> Allele .....	71
3.1.2.6 Der <i>discs lost</i> Phänotyp.....	72
3.1.2.7 Klonale Analyse von <i>discs lost</i> .....	72
3.1.2.8 Möglicher Einfluss von Hintergrundmutationen .....	73
3.1.2.9 <i>discs lost</i> mutante Zellen haben einen Selektionsnachteil.....	74

## Inhaltsverzeichnis

3.1.2.10 DNA Synthese und DNA Gehalt erscheinen normal in <i>discs lost</i> mutanten Klonen.....	75
3.1.2.11 Zellpolarität ist in <i>discs lost</i> mutanten Klonen nicht beeinträchtigt.....	76
3.1.2.12 <i>discs lost</i> führt zu vermehrtem Zelltod .....	77
3.1.2.13 <i>discs lost</i> RNAi führt zu einer <i>discs lost</i> Phänokopie in der Flügelimaginalscheibe.....	78
3.1.2.14 <i>ptc&gt;discs lost<sup>RNAi</sup></i> als quantifizierbares Modellsystem.....	79
3.1.2.15 Apoptose und allgemeine Proliferation .....	80
3.1.2.16 Zellzyklus.....	81
3.1.2.17 <i>discs lost</i> Mutanten haben reduzierte Anzahl an Blutzellen.....	82
3.1.3 Analyse von <i>patj</i> .....	83
3.1.3.1 Die Funktion von Patj .....	83
3.1.4 Analyse von <i>α-spectrin/klötzchen</i> .....	86
3.1.4.1 <i>α-spectrin</i> zeigt intragene Komplementation .....	86
3.1.4.2 Molekulare Analyse der <i>α-spectrin/klo</i> Mutanten .....	88
3.1.4.3 Sequenzanalyse verschiedener <i>α-spectrin</i> Mutanten.....	91
3.1.4.4 Die klonale Analyse der <i>α-spectrin</i> Mutanten .....	91
3.1.4.5 Analyse adulter Phänotypen von <i>α-spectrin</i> .....	93
3.1.4.6 Generierung eines UAS <i>α-Spectrin</i> Konstruktes.....	94
3.1.4.7 Phänotypische Analyse der Mutanten .....	95
3.1.4.8 Der <i>klötzchen</i> Phänotyp ist kältesensitiv .....	96
3.1.4.9 Die <i>α-spectrin</i> Mutante zeigt nach Kältebehandlung <i>klötzchen</i> -artige Phänotypen.....	98
3.1.4.10 Möglicher Einfluss von Hintergrundmutationen .....	98
3.1.4.11 Rettung des <i>klötzchen</i> Phänotyps durch <i>ubi-α-spectrin</i> .....	100
3.1.4.12 <i>β-spectrin</i> zeigt Kältesensitivität .....	100
3.1.4.13 <i>α-Spectrin</i> Proteinlevel ändern sich durch Kältebehandlung nicht.....	101
3.1.4.14 Maternale <i>α-Spectrin</i> Expression.....	102
3.1.4.15 Allgemeine Stressresistenz .....	103
3.2 Visualisierung der Mittellinienglia Entwicklung .....	104
3.2.1 Generierung von <i>in vivo</i> Markierungen der Mittellinienglia.....	104
3.2.2 Zeitrafferaufnahmen von <i>slit</i> -Gal4 UAS GFP Tieren.....	106
3.3 Die Rolle von Septate Junctions in der Entwicklung der Mittellinienglia.....	108
3.3.1 Die Expression von Discs large während der Mittellinienglia Entwicklung .....	108

## Inhaltsverzeichnis

3.3.2 Die Expression von Neurexin IV während der Mittellinienglia Entwicklung .....	109
3.3.3 Die Expression von Coracle während der Mittellinienglia Entwicklung	111
3.3.4 <i>neurexin</i> <sup>4304</sup> Mutanten zeigen ein unvollständiges Umhüllen der Kommissuren .....	111
3.3.5 Rolle des Spectrin Cytoskeletts in der terminalen Differenzierung der Mittellinienglia.....	112
3.3.6 Septate Junctions und die Blut-Hirn-Schranke .....	113
3.3.7 Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke .....	114
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>117</b>
4.1 Die EMS Mutagenese .....	117
4.1.1 <i>no name yet</i> .....	118
4.1.2 <i>discs lost</i> .....	119
4.1.2.1 <i>discs lost</i> wird nicht für epitheliale Zellpolarität benötigt .....	120
4.1.2.2 <i>discs lost</i> kodiert keinen $\alpha$ -Spectrin Regulator.....	120
4.1.2.3 Das Überdauern der maternalen <i>discs lost</i> Komponente .....	121
4.1.2.4 <i>discs lost</i> mutante Zellen haben einen Selektionsnachteil.....	121
4.1.2.5 <i>Discs lost</i> ist kein Regulator der Apoptose .....	122
4.1.2.6 Mögliche Rolle von <i>Discs lost</i> im Zellzyklus.....	123
4.1.2.7 Codanin-1 ist das menschliche <i>Discs lost</i> Homolog .....	124
4.1.3 Funktion von Patj .....	125
4.1.4 <i><math>\alpha</math>-spectrin/klötzchen</i> .....	127
4.1.4.1 Kältesensitivität.....	127
4.1.4.2 Die Rolle von Hintergrundmutationen.....	128
4.1.4.3 Genereller Einsatz der Kältebehandlung .....	129
4.1.4.4 Mögliche Funktion von Spectrin in der Kälteresistenz .....	129
4.1.4.5 Rolle von <i><math>\alpha</math>-spectrin</i> in der Entwicklung des Auges .....	130
4.1.4.6 Charakterisierung der <i><math>\alpha</math>-spectrin</i> Mutanten .....	131
4.2 Rolle von Septate Junctions in der Gliaentwicklung- und Funktion .....	133
4.2.1 Funktion von pleated Septate Junctions in <i>Drosophila</i> .....	134
4.2.2 Septate Junctions in Vertebraten .....	135
4.2.3 Funktion von Septate Junctions und des Spectrin Cytoskeletts in der Entwicklung der Mittellinienglia.....	136
4.2.3.1 Funktion von <i>neurexin</i> in Mittellinienglia .....	136
4.2.3.2 Mögliche Rolle von Septate Junctions in der Mittellinienglia Entwicklung.....	137
4.2.3.3 Funktion von <i>spectrin</i> in Mittellinienglia .....	138
4.2.3.4 Rolle von Zell-Zell Kontakten in der trophischen Regulation der Mittellinienglia .....	139

## Inhaltsverzeichnis

4.2.4 <i>in vivo</i> Analyse der Mittellinienglia Entwicklung .....	140
4.2.4.1 Interaktion von Mittellinienglia mit Makrophagen .....	141
4.2.5 Test zur Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke .....	142
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>144</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>145</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>162</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	163
7.2 Verwendete Oligonukleotide .....	164
7.2.1 Analyse von <i>Df(3L)kloP3</i> .....	164
7.2.2 Analyse von <i>patj</i> .....	165
7.2.3 Analyse von <i>discs lost</i> .....	166
7.2.4 Analyse von <i>α-spectrin</i> .....	167

## Einleitung

### 1. Einleitung

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* spielt seit fast 100 Jahren eine wichtige Rolle in der genetischen, entwicklungsbiologischen und zellbiologischen Forschung. Neben einer einfachen Haltung der Tiere und der kurzen Generationszeit ist die Fliege vor allem wegen der Vielzahl verfügbarer genetischer Manipulationsmöglichkeiten ein ideales Forschungsobjekt. Es sind tausende mutante Stämme erhältlich, das Genom ist vollständig sequenziert und annotiert (Adams et al., 2000) und es lassen sich leicht transgene Tiere herstellen (Rubin et al., 2000). Das *Drosophila* Genom ist zudem vergleichsweise einfach organisiert, so dass es im Gegensatz zu Vertebraten wenig redundante Genfunktionen enthält. Auch die Morphologie der Tiere ist vergleichsweise einfach. So ist die Komplexität und Anzahl der Zellen in *Drosophila* z.B. deutlich geringer als in Vertebraten. Interessant ist dabei besonders, dass sich viele Erkenntnisse, die aus dem Modellsystem *Drosophila* gewonnen werden, auch auf andere höhere Organismen wie z. B. Vertebraten übertragen lassen. Vor allem basale Mechanismen der Signalübertragung, Organspezifizierung, Zelldifferenzierung und Zellfunktion und die entsprechenden, beteiligten Faktoren sind in der Evolution oft konserviert (Reiter et al., 2001; Rubin et al., 2000; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

#### 1.1 Die Entwicklung des embryonalen Nervensystems von *Drosophila*

##### 1.1.1 Spezifizierung des Neuroektoderms

Im Epithel des zellulären Blastoderms eines frühen *Drosophila* Embryos sind die Bereiche die Mesoderm, Neuroektoderm und dorsales Ektoderm bereits spezifiziert (Bier, 1997). Im ventralen Bereich kommt es zur Expression der Mesoderm determinierenden Gene *twist (twi)* und *snail (sna)*, während im ventro-lateralen Bereich die Gene *rhomboid (rho)*, *short gastrulation (sog)* und *lethal of scute (l'sc)* aktiviert werden, die für die Vermittlung neuronaler Kompetenz benötigt werden (Bier et al., 1990; Francois et al., 1994; Martin-Bermudo et al., 1995). In dieser Region entsteht das Neuroektoderm, aus dem die Neurone und Gliazellen des zentralen Nervensystems hervorgehen.

## Einleitung

Zwischen Mesoderm und Neuroektoderm wird das so genannte Mesektoderm spezifiziert. Es handelt sich um eine einzelne Zellreihe, welche die beiden Bereiche trennt (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988). Während der Gastrulation invaginiert das ventral liegende Mesoderm in den Embryo, so dass die mesektodermalen Zellreihen an der ventralen Mittellinie des Embryos zusammentreffen. Das Mesektoderm besitzt wie das Neuroektoderm neurale Kompetenz und aus ihm gehen schließlich Mittellinienneurone und Mittellinienglia hervor (Klämbt et al., 1991). Entscheidend für die mesektodermale Differenzierung ist die Expression des bHLH-PAS Transkriptionsfaktors *single-minded (sim)*. Es handelt sich bei *sim* um einen Masterregulator für mesektodermale Entwicklung, der spezifische Mittelliniengene aktivieren kann (Nambu et al., 1990; Nambu et al., 1991). Die Expressionsdomäne von *sim* wird durch Interaktionen der Proteine Dorsal, Twist, Snail und Suppressor of Hairless (Su(H)) festgelegt (Kosman et al., 1991; Leptin, 1991; Morel and Schweisguth, 2000). Suppressor of Hairless scheint dabei auf lateraler Seite die *sim* Expression zu reprimieren, indem es dem aktivierenden Effekt von Dorsal und Twist entgegenwirkt (Morel and Schweisguth, 2000). Diese Repression wird dann durch *Notch (N)* Aktivität im Mesektoderm aufgehoben, so dass *sim* exprimiert werden kann (Menne and Klämbt, 1994).

### 1.1.2 Proneurale Cluster und Selektion eines Neuroblasten

Die Zellen des Neuroektoderms haben das Potential entweder neuronale Vorläuferzellen, die Neuroblasten (NB), zu bilden oder sich zu epidermalen Vorläuferzellen, den Epidermoblasten (EB) zu entwickeln. Die Aussonderung der Neuroblasten ist von zwei Gengruppen abhängig, den proneuralen Genen und den neurogenen Genen.

Zu den proneuralen Genen gehören die bHLH Transkriptionsfaktoren des *achaete/scute* Komplexes *achaete (ac)*, *scute (sc)* und *lethal of scute (l'sc)*. Sie werden in so genannten proneuralen Clustern exprimiert und vermitteln die Kompetenz einen Neuroblasten zu bilden (Martin-Bermudo et al., 1991; Skeath and Doe, 1996; Skeath et al., 1995). Diese Cluster bestehen aus 4 bis 6 Zellen und über die Wirkung der neurogenen Gene *Notch* und *Delta (D)* wird eine von diesen ausgewählt sich als Neuroblast zu differenzieren (Beatus and Lendahl, 1998; Bray, 1998; Heitzler and Simpson, 1991; Muskavitch, 1994).

## Einleitung

Delta ist ein membranständiger Ligand von Notch. Aktiviertes Notch kann über *Suppressor of Hairless* und Gene des *Enhancer of split-Komplexes (E(Spl)-C)* die Expression von proneuralen Genen des *achaete/scute-Komplexes* reprimieren (Heitzler et al., 1996; Kidd et al., 1998; Struhl and Adachi, 1998). Diese wiederum steuern direkt die Expression von *Delta*. Hohe Notch Aktivität in Zellen des Clusters führt also zu einer Reduktion neuronaler Kompetenz und gleichzeitig zu einer geringeren Fähigkeit der Zelle, in umgebenden Zellen Neuroblastenbildung zu verhindern.

### 1.1.3 Delamination der Neuroblasten

Vom Stadium 8 bis zum Stadium 11 (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997) delaminieren Neuroblasten in fünf Segregationswellen (SI-SV) aus dem Neuroektoderm ins Innere des Embryos. Es kommt pro Hemisegment zu der Bildung von ca. 30 Neuroblasten (Bossing and Technau, 1994; Bossing et al., 1996a; Bossing et al., 1996b; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Aufgrund ihres Entstehungsortes und -zeitpunktes haben die Neuroblasten eine eindeutige Identität, die sich auch in der Expression unterschiedlicher molekularer Marker widerspiegelt (Edenfeld et al., 2002).

Aus den Neuroblasten gehen Neurone und Gliazellen des zentralen Nervensystems hervor. Pro abdominalem Hemisegment werden etwa 350 Neurone und 30 Gliazellen gebildet. Man unterscheidet reine Neuroblasten (NB), die nur Neurone bilden, Neuroglioblasten (NGB), aus denen Neurone und Gliazellen hervorgehen können und reine Glioblasten (GB), aus denen nur Gliazellen entstehen (Bossing and Technau, 1994; Bossing et al., 1996b; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Die Neuroblasten teilen sich mehrmals asymmetrisch in einem stammzellähnlichen Teilungsmodus und bringen erneut einen Neuroblast und eine Ganglienmutterzelle (GMC) hervor. Die kleinere Ganglienmutterzelle teilt sich und es entstehen entweder zwei Neurone oder zwei Gliazellen (Typ1 Modus) oder ein Neuron und eine Gliazelle (Typ 2-Modus)(Udolph et al., 2001).

### 1.1.4 Axonale Wegfindung

Die aus dem Mesektoderm und dem Neuroektoderm entstandenen Zellen differenzieren sich zu Neuronen und Gliazellen und bilden so das neuronale Netzwerk, das für koordinierte Muskelbewegung und andere larvale

## Einleitung

Verhaltensmuster essentiell ist. Die Hauptaxontrakte des Bauchmarks eines *Drosophila* Embryos im Stadium 17 sind als Strickleiternnervensystem organisiert. Die longitudinal verlaufenden Konnektive sind durch die quer verlaufenden Kommissuren verbunden (Abb. III). In jedem Segment verbinden eine anteriore und eine posteriore Kommissur die beiden Körperhälften.

Die ipsilateral projizierenden Neurone, welche nie die Mittellinie überqueren, machen nur etwa 10% der Gesamtneurone aus. Die übrigen Neurone projizieren kontralateral, das heißt ihre Wachstumskegel müssen die Mittellinie überqueren und auf der gegenüberliegenden Seite in den Konnektiven nach anterior oder posterior zu projizieren, um dann das finale Ziel, wie andere Neurone oder Muskeln, zu erreichen. Das Kreuzen der Wachstumskegel wird durch Attraktions- und Repulsionssignale, die an der Mittellinie generiert werden, gesteuert. Von besonders großer Bedeutung sind dabei zum einen die Netrine (Netrin-A und Netrin-B), die als attraktives Signal fungieren (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996) und zum anderen Slit, welches als repulsives Signal auf die Wachstumskegel wirkt (Kidd et al., 1999). Netrin und Slit werden von Mittellinienzellen sezerniert und bilden Gradienten, die von Rezeptoren der Axone interpretiert werden können (Serafini et al., 1996; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

Der Rezeptor der Netrine ist Frazzled. Dieses Transmembranprotein wird in kommissuralen und longitudinalen Axonen des ZNS exprimiert (Kolodziej et al., 1996) und kann hier über seine intrazelluläre Domäne Wachstumskegel zur Mittellinie navigieren (Bashaw and Goodman, 1999). *frazzled* oder *netrin* Mutanten zeigen dementsprechend eine deutliche Reduktion der Kommissuren. Einige Axonbündel sind aber weiterhin in der Lage kontralateral zu projizieren, so dass weitere Attraktionsmechanismen vorliegen müssen (Hummel et al., 1999b).

Slit fungiert als repulsives Signal für Wachstumskegel. Sowohl ipsilateral als auch kontralateral projizierende Neurone werden von Slit an der Überquerung der Mittellinie gehindert. Diese Wirkung wird über den repulsiv wirkenden Slit Rezeptor Roundabout (Robo) vermittelt. Es gibt neben Robo noch die verwandten Robo2 und Robo3 Proteine in *Drosophila*, die ebenfalls als repulsive Rezeptoren dienen und zusammen die Lage verschiedener Faszikel entlang der longitudinalen Axontrakte determinieren (Rajagopalan et al., 2000a; Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000a; Simpson et al., 2000b).

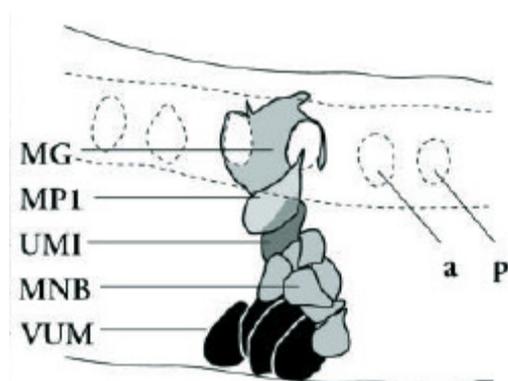
## 1.2 Die Entwicklung der Gliazellen

Die Gliazellen des ZNS lassen sich in zwei Hauptpopulationen unterteilen: In die Mittellinienglia, die aus dem Mesektoderm hervorgehen und die lateralen Glia, die aus dem Neuroektoderm hervorgehen (Bossing and Technau, 1994; Bossing et al., 1996b; Klämbt et al., 1991; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997).

### 1.2.1 Entwicklung und Funktion der Mittellinienglia

#### 1.2.1.1 Die Entwicklung der Mittellinie

Die Zellen der Mittellinie sind die ersten Zellen im ZNS, die spezifiziert werden (Crews et al., 1988; Martín-Bermudo et al., 1995; Menne and Klämbt, 1994; Thomas et al., 1988). Durch die Invagination des Mesoderms treffen rechte und linke Mesektodermanlage an der Mittellinie zusammen und es bildet sich eine durchgehende Zellreihe von 7-8 Zellen pro Segment (Bossing and Technau, 1994; Klämbt et al., 1991). Die Zellen teilen sich synchron im Epithel und bilden später neben den Mittellinienglia (MG) noch MP1-, UMI, und VUM-Neuronen sowie die Nachkommen des medianen Neuroblasten (MNB) (Bossing and Technau, 1994; Foe, 1989; Klämbt et al., 1991). In der weiteren Entwicklung kann es dann zu weiteren Teilungen kommen. Gegen Ende der Embryogenese liegen dann insgesamt ca. 26 Mittellinienzellen pro Segment vor, die sich durch ihre Morphologie, Art der Projektion und Position und anhand der Expression von spezifischen Markern identifizieren lassen (Abb. I (Bossing and Technau, 1994; Goodman and Doe, 1993; Klämbt and Goodman, 1991; Klämbt et al., 1991)).



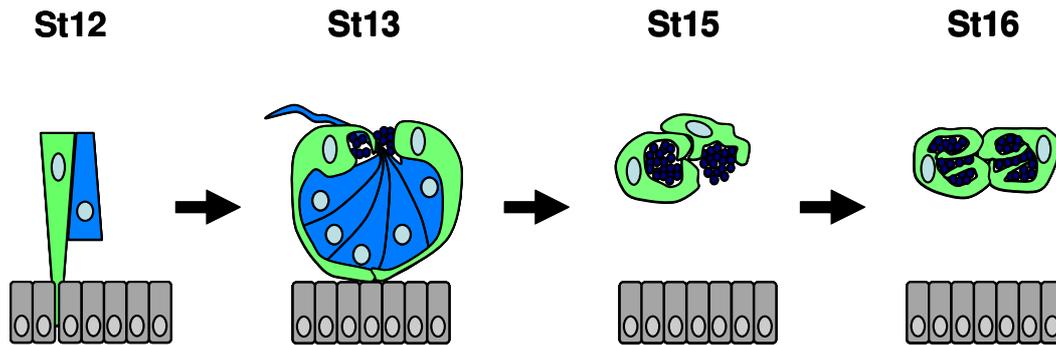
**Abb. I: Position der verschiedenen Mittellinienzellen.** (aus Bossing and Technau, 1994). a: anteriore Kommissur p: posteriore Kommissur; MG: Mittellinienglia; UMI: Unpaired Median Interneurons; MNB: Nachkommen des Medianen Neuroblasten; VUM: Ventral Unpaired Median -Neurone

## Einleitung

Genetische Experimente und die Untersuchung von spezifischen Enhancertraps legen nahe, dass die Vorläufer der verschiedenen Zelltypen durch Positionsinformationen von Segmentpolaritätsgenen wie z.B. *hedgehog* und *wingless* determiniert werden (Hummel et al., 1999a). Die Mittellinienglia entwickeln sich aus den anterior liegenden Zellen der Mesektoderm Anlage und die Mittellinien-Neurone aus den posterioren Zellen (Klämbt et al., 1991). In *hedgehog* Mutanten kommt es nicht zu einer Induktion posterioren Schicksals, so dass sich die Zellen hier nach anteriorem Schicksal differenzieren. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Anzahl an Mittellinienglia, während die Neurone reduziert sind (Hummel et al., 1999a).

### **1.2.1.2 Die Entwicklung und Morphologie der Mittellinienglia**

Nachdem die Mittellinienglia im Mesektoderm spezifiziert wurden, delaminieren sie ins Innere des Embryos behalten aber apikale Zellausläufer im Epithel. Diese verdünnen sich im Laufe der Entwicklung und ziehen die im Epithel liegenden Bereiche der Zelle zurück (Abb. II). Die Ausläufer bleiben bis ins Stadium 13 erhalten, wo sie zwar nicht mehr in der epithelialen Schicht inseriert sind, aber doch noch an deren basalen Oberfläche adhärieren. In der Regel kommt es zum Kontakt der Ausläufer von anterioren und posterioren Mittellinienglia. Die Zellkörper der Mittellinienglia sind nach dorsal gewandert und befinden sich damit in unmittelbarer Nähe der Kommissuren. Ab dem Stadium 13 werden die apikalen Zellausläufer zurückgebildet, so dass die Mittellinienglia ihre polare Morphologie verlieren. Sie interkalieren zwischen die frühe anteriore und posteriore Kommissur und trennen sie. Sind die Kommissuren getrennt, beginnt die nächste Phase der Mittellinienglia Differenzierung. Die Mittellinienglia beginnen die Kommissuren zu umhüllen und es werden in einer terminalen Differenzierung (Stadium 15/16) feine Fortsätze ausgebildet, die einzelne Axonfaszikel in den Kommissuren voneinander trennen (Klämbt et al., 1996; Klämbt et al., 1991; Sadlowski, 1995; Scholz et al., 1997).



**Abb. II: Schematische Übersicht der embryonalen Mittellinienglia Entwicklung.** Es ist eine schematische Lateralansicht dargestellt. Mittellinienglia sind in grün, Neurone in blau, kommissurale Axone in dunkelblau und die Epidermiszellen in grau dargestellt. Details siehe Text.

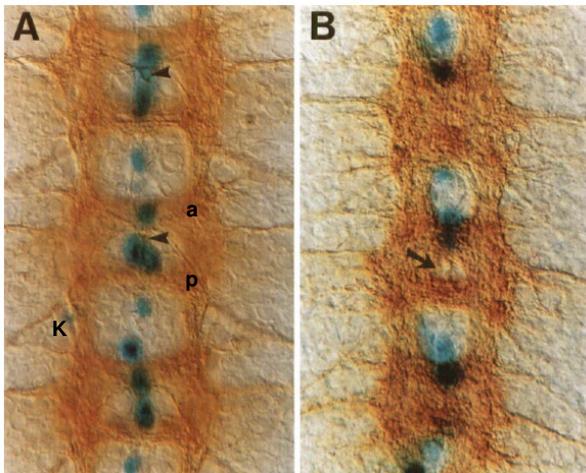
### 1.2.1.3 Die Bildung der Konnektive und die Trennung der Kommissuren

Für die Entwicklung der lateralen Konnektive sind vier Klassen von Pionierneuronen (pCC, MP1, dMP2 und vMP2) beschrieben worden (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Jacobs and Goodman, 1989). Sie kreuzen nie die Mittellinie, sondern schicken ihre Wachstumskegel ipsilateral entweder in anteriore oder posteriore Richtung. Haben diese Pionieraxone ihren Weg gefunden, orientieren sich später auswachsende Neurite an diesem Axongerüst und bilden die longitudinalen Konnektive (Hidalgo and Brand, 1997).

In der Entwicklung wird im frühen Stadium 12 zuerst die posteriore Kommissur angelegt. Die Axone wachsen in Richtung der Fortsätze der VUM-Neuronen aus und kreuzen schließlich die Mittellinie. Die VUM-Axone liegen dann anterior der ersten Kommissur. Danach bildet sich die zweite, anteriore Kommissur. Die Axone wachsen über die Mittellinie und liegen zunächst in direkter Nachbarschaft zu den Axonen der posterioren Kommissur. Die Kommissuren werden zu diesem Zeitpunkt durch die dorso-median projizierenden Axone der VUM-Neurone getrennt (Klämbt et al., 1991). Zu diesem Zeitpunkt liegen die Mittellinienglia noch anterior der Kommissuren. Genetische Daten deuten darauf hin, dass die Axone der VUM Neurone den Mittellinienglia als Substrat dienen, damit diese zwischen die eng zusammen liegenden Kommissuren interkalieren können (Hummel et al., 1999b; Klämbt et al., 1991). Kommt es zu Defekten in der Spezifizierung der Mittellinienglia oder den Mittellinien-Neuronen, beziehungsweise ist die Kommunikation der beiden Zelltypen gestört, entwickelt sich ein so genannter fusionierte-Kommissuren-Phänotyp, in dem

## Einleitung

anteriore und posteriore Kommissur nicht getrennt werden, weil die Interkalation und anschließende Umhüllung nicht stattfinden kann (Abb. III (Hummel et al., 1999b)).



**Abb. III: Defekte in Mittellinienglia führen zu fusionieren Kommissuren.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen, anterior oben. Axonmuster in braun, Mittellinienglia in blau. Konnektive: K. (A) Im Wildtyp Embryo sind anteriore (a) und posteriore (p) Kommissur durch Mittellinienglia getrennt. Die Mittellinienglia sind eng mit den Projektionen der VUM Neurone assoziiert (Pfeilspitzen). (B) In *Spitz*-Mutanten werden die Kommissuren getrennt, da weniger Mittellinienglia gebildet werden, die nicht zwischen anteriore und posteriore Kommissur interkalieren können (Pfeil). Abbildung aus Klämbt et al. 1996.

### 1.2.1.4 Überleben der Mittellinienglia

Bis zum Stadium 13 sind bis zu 10 Mittellinienglia pro Segment gebildet worden (Bergmann et al., 2002). Bis zum Ende der Embryogenese überleben allerdings nur ca. drei Zellen und die übrigen Zellen sterben ab (Klämbt et al., 1991; Sonnenfeld and Jacobs, 1995a; Zhou et al., 1995; Zhou et al., 1997). Ein Teil des Zelltods der Mittellinienglia wird über die Apoptosegene *reaper* und *grim* gesteuert (Zhou et al., 1997). Das Überleben der restlichen sechs Mittellinienglia ist vom engen Kontakt mit Neuronen abhängig (Noordermeer et al., 1998; Sonnenfeld and Jacobs, 1995a). Dabei fungiert sekretiertes Spitz (sSpi) als ein trophisches Überlebenssignal, das vermutlich von Neuronen sekretiert wird. Der EGF-ähnliche Ligand Spitz kann den in Mittellinienglia exprimierten EGF-Rezeptor aktivieren und so deren Apoptose unterdrücken (Bergmann et al., 2002; Schweitzer et al., 1995b; Sonnenfeld and Jacobs, 1995a). Ras wird aktiviert und schließlich kommt es zur Phosphorylierung des Apoptose Regulators Hid (*head involution defective*) durch die MAP Kinase. Hid wird durch die Phosphorylierung inaktiviert und kann dadurch das antiapoptotische Protein Inhibitor of Apoptosis (IAP) nicht mehr hemmen (Goyal et al., 2000). Es kommt so zur Apoptose der Mittelliniengliazellen, die eine niedrige EGFR-Aktivität besitzen (Bergmann et al., 2002).

Dabei ist die das Überlebenssignal Spitz offensichtlich limitiert und die Mittellinienglia können nur überleben, wenn sie in engem Kontakt mit den produzierenden Zellen

## Einleitung

stehen. Die Adhäsion der Mittellinienglia an Neuronen ist z.B. abhängig von Wrapper, einem Ig-Domänen Protein, das spezifisch auf der Zelloberfläche von Mittellinienglia exprimiert wird. In *wrapper* Mutanten ist die Adhäsion zwischen Mittellinienglia und Neuronen gestört, es kommt zu keiner Umhüllung der Axone und die Mittellinienglia sterben ab (Noordermeer et al., 1998).

Durch die EGFR Aktivität wird nicht nur Hid von der MAPK phosphoryliert, was zu einer Unterdrückung von Apoptose führt, sondern auch der Transkriptionsfaktor Pointed P2 (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994). Dieser wird aktiviert und kann Mittellinienglia-spezifische Differenzierung einleiten (Klämbt, 1993; Scholz et al., 1997).

### 1.2.1.5 Weitere Gene die zu einer Fusion der Kommissuren führen

In einem Screen auf embryonale ZNS Phänotypen wurden etwa 20 weitere Loci aufgedeckt, die neben den bekannten Faktoren zu fusionierten Kommissuren führen (Hummel et al., 1997a; Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Die meisten dieser Mutationen sind bisher nicht im Detail untersucht, allerdings deuten genetische Daten auf Funktionen entweder in den Mittellinienglia selbst oder in VUM Neuronen hin (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Zu den Genen, die genauer charakterisiert werden konnten, gehören z.B. *tramtrack* (Giesen et al., 1997), *fear of intimacy* (Pielage et al., 2004), *kette* (Bogdan and Klämbt, 2003; Hummel et al., 2000) und *klötzchen* (Pielage, 2002).

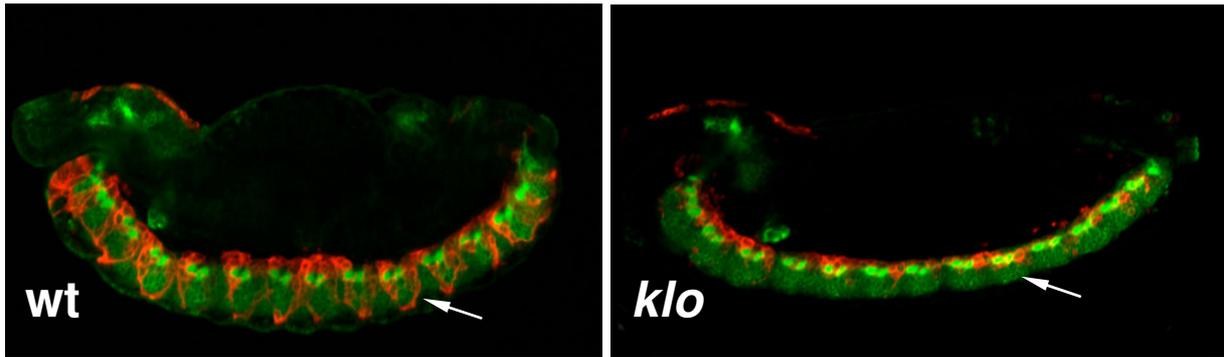
Für *kette* konnte z.B. gezeigt werden, dass es für die korrekte Projektion der VUM Neuronen benötigt wird. *kette* ist im gesamten Tierreich stark konserviert und kodiert für ein Protein, das im einem Komplex mit den Aktin-Polymerisationsfaktoren WASP und WAVE vorliegt. Dort reguliert es unter anderem die Aktin-Polymerisation im Wachstumskegel (Bogdan and Klämbt, 2003; Hummel et al., 2000).

Über eine Analyse der Gene der so genannten Halloween-Gruppe (*shroud*, *shadow*, *spook*, *shade* und *disembodied*), die zu einer Fusion der Kommissuren führen, ergaben sich Hinweise auf eine Regulation der Zellzahl und Differenzierung der Mittellinienglia über Ecdyson und den Transkriptionsfaktor Fos (Giesen et al., 2003). Ob diese Regulation parallel zum EGFR Signalweg verläuft, ist bisher nicht bekannt. Mittlerweile sind eine Reihe weiterer Gene bekannt, die in Mittellinienglia exprimiert sind, deren Funktion in der Mittellinienglia Entwicklung allerdings noch unklar ist (Jacobs, 2000; Kearney et al., 2004).

### 1.2.1.6 Analyse von *klötzchen*

Auch Mutationen in *klötzchen* führen zu fusionierten Kommissuren. Genetische Daten deuteten dabei auf eine Rolle in den Mittellinienglia hin (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Deshalb wurde die Entwicklung der Mittellinienglia in den Mutanten genauer untersucht (Pielage, 2002). Es wurde beschrieben, dass die Mittellinienglia zwar gebildet werden, aber schon früh Defekte in ihrer Differenzierung zeigen. Die lang gestreckten apikalen Fortsätze der Mittellinienglia werden demnach in *klötzchen* Mutanten vorzeitig zurückgezogen (Abb. IV). In späteren Stadien findet ein Umhüllen der Kommissuren nicht statt und es kommt zu einem vermehrten Absterben der Mittellinienglia (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b; Pielage, 2002). Aufgrund dieses Phänotyps in den stark polar organisierten Mittellinienglia wurde geschlossen, dass *klötzchen* für die Aufrechterhaltung die Polarität der Mittellinienglia und eventuell weiterer Zelltypen benötigt wird. (Pielage, 2002).

Die genetische Analyse zeigte, dass *klötzchen* im genomischen Bereich 62B 3-4 des dritten Chromosoms liegen muss. In diesem Bereich liegt das Gen  $\alpha$ -*spectrin*. Weitere Analysen zeigten, dass es sich bei *klötzchen* tatsächlich um  $\alpha$ -*spectrin* handeln könnte (Pielage, 2002). Allerdings ergaben sich auch Widersprüche. So zeigt z.B. ein publiziertes Nullallel von  $\alpha$ -*spectrin* (Lee et al., 1993) keine groben Defekte in der Mittellinienglia Entwicklung (Pielage, 2002). Allerdings ist die genomische Situation für  $\alpha$ -*spectrin* komplex. Es liegt ein weiteres Gen im Intron von  $\alpha$ -*spectrin* und teilt sich darüber hinaus noch das erste, nicht translatierte Exon mit  $\alpha$ -*spectrin* (Pielage, 2002; Stork, 2002). Es wurde postuliert, dass es sich bei diesem Gen um einen Regulator der maternalen  $\alpha$ -*spectrin* mRNA Expression handeln könnte und dass die Mutationen in *klötzchen* dieses „intronische“ Gen betreffen (Pielage, 2002). Es wurde vermutet, dass es durch diese Destabilisierung der maternalen  $\alpha$ -*spectrin* mRNA in *klötzchen* Mutanten zu einem frühen Verlust der  $\alpha$ -Spectrin Expression kommt. In der  $\alpha$ -*spectrin* Nullmutante kommt es durch die maternale Expression nicht zu wesentlichen embryonalen Defekten. Fehlt diese jedoch durch eine Destabilisierung der maternalen mRNA, könnten in Mittellinienglia Defekte auftreten (Pielage, 2002).



**Abb. IV: Defekte in den Mittellinienglia in *klötzchen* mutanten Embryonen.** Laterale Ansicht von *Drosophila* Embryonen im Stadium 13. Im Wildtyp (wt) zeigen die Mittellinienglia Ausläufer (Pfeil), die mit ihrem apikalen Ende an der Epidermis enden. In *klötzchen* Mutanten (klo) sind diese Ausläufer nicht mehr vorhanden. Abbildung aus Pielage, 2002.

Zwar konnte bisher nicht geklärt werden, ob *klötzchen* durch  $\alpha$ -spectrin oder das „intronische“ Gen codiert wird, jedoch ergaben sich Hinweise auf eine Rolle  $\alpha$ -Spectrins in der Entwicklung der Mittellinienglia und eventuell sogar in der Aufrechterhaltung von Zellpolarität (Pielage, 2002).

### 1.2.1.7 Epitheliale Zellpolarität

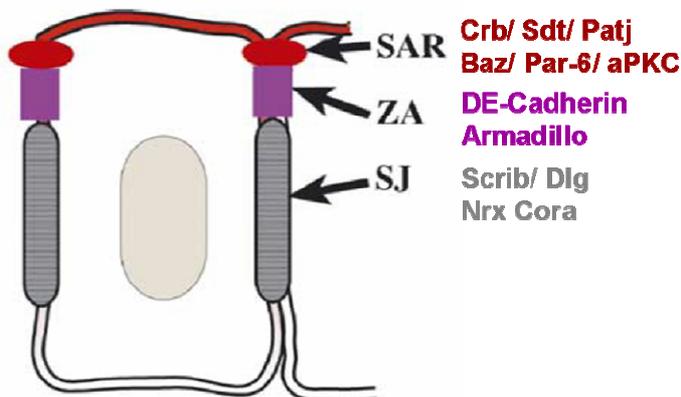
In Epithelien ist Zellpolarität besonders gut untersucht und neben der morphologischen Polarität sind diverse molekulare Marker, die unterschiedliche Regionen der Zellmembran markieren, bekannt (siehe Abb. V, (Woods et al., 1997)). Die Plasmamembran von epithelialen Zellen ist in einen apikalen und in einen basolateralen Bereich unterteilt. Dieser kann durch die Lokalisation diverser Proteinkomplexe und durch das Auftreten von Zell-Zell-Kontakten weiter unterteilt werden und im Wesentlichen werden die Subapikale Region (SAR), die Zonula Adherens (ZA), und die basolaterale Region unterschieden (Abb. V, (Knust, 2000; Müller and Bossinger, 2003)). In der ZA befinden sich Zell-Zell-Kontakte die so genannten Adherens Junctions (AJ) und in der basolateralen Region entwickeln sich im differenzierten Epithel die pleated Septate Junctions (engl. pSJ, (Tepass and Hartenstein, 1994; Tepass et al., 2001)). In der ZA ist das homophile Adhäsionsmolekül E-Cadherin konzentriert, das auf cytoplasmatischer Seite über  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin (Armadillo) an das Aktincytoskelett gebunden ist (Takahashi et al., 2005; Tepass, 2002; Yap et al., 1997). In Vertebraten befinden sich apikal der ZA Tight Junctions (engl. TJ). Diese Struktur, die als parazelluläre Diffusionsbarriere dient, fehlt in *Drosophila* (Tepass and Hartenstein, 1994).

## Einleitung

Allerdings wird diese Funktion von den basolateral gelegenen Zell-Zell Kontakten der pSJ übernommen (Behr et al., 2003; Tepass et al., 2001). Hier lokalisieren diverse SJ Marker wie Discs large (Dlg), Neurexin IV (Nrx) oder Coracle (Cora) (Baumgartner et al., 1996; Fehon et al., 1994; Woods and Bryant, 1991).

Diese Polarität wird im Wesentlichen von drei Proteinkomplexen etabliert und aufrechterhalten (Kramer, 2000; Müller and Bossinger, 2003). In der SAR lokalisieren der Crumbs-Komplex und der Bazooka-Komplex. Der Crumbs Komplex enthält das Transmembranprotein Crumbs, das MAGUK- (Membrane associated Guanylate Kinase) Protein Stardust und das Multi PDZ-Domänen Protein Patj (Protein-associated to tight junctions (Lemmers et al., 2002)), wobei Patj über Stardust an Crumbs bindet (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Roh et al., 2002).

Basal der ZA liegt ein weiterer Komplex vor, der sich aus den Proteinen Scribble (Scrib) Discs large (Dlg) und Lethal giant larvae (Lgl) zusammensetzt (Bilder, 2004). Diese drei Komplexe haben Einfluss auf die Bildung der ZA, interagieren miteinander und bestimmen so die Lokalisation und Ausdehnung der verschiedenen Zonen (Betschinger et al., 2003; Bilder, 2004; Müller and Bossinger, 2003; Tanentzapf and Tepass, 2003).



**Abb. V: Epitheliale Zellpolarität.** SAR: Subapikale Region, ZA: Zonula Adherens, SJ: Septate Junctions. Abkürzungen der beteiligten Proteine, siehe Text. Verändert nach Müller and Bossinger, 2003.

Während der Crumbs und der Bazooka-Komplex an der Membran apikalen Charakter vermitteln (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Wodarz et al., 1995; Wodarz et al., 2000), hemmt der basale Scrib/Dlg/Lgl Komplex diesen apikalisierenden Effekt (Bilder et al., 2000). Durch die verschiedenen Protein-Protein-Interaktionsdomänen der Proteine in diesen Komplexen können weitere Polaritätsdeterminanten wie z.B. die Signaltransduktionsmoleküle Rac1 und Cdc42 oder Komponenten des Cytoskeletts wie  $\beta$ <sub>H</sub>-Spectrin und Moesin zu den distinkten

## Einleitung

Membrandomänen rekrutiert werden (Bilder, 2004; Doe, 2001; Medina et al., 2002; Müller and Bossinger, 2003; Pellikka et al., 2002; Tepass et al., 2001).

### 1.2.1.8 Das Spectrin Cytoskelett

Spectrine sind große, lang gestreckte Strukturproteine die eine Vielzahl der so genannten Spectrin-repeats (engl.) enthalten und Aktinfilamente und weitere Proteine quervernetzen können. Sie sind in der Evolution stark konserviert und kommen in allen Metazoen vor. Spectrine bilden Heterodimere aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Untereinheit, die antiparallel binden. Zwei dieser ( $\alpha\beta$ ) Dimere assoziieren in einer „Kopf an Kopf“-Formation zu einem ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> Heterotetramer (Bennett, 1989; Bennett and Baines, 2001; Deng et al., 1995).

Diese Spectrinmultimere bilden ein ausgedehntes Proteinnetzwerk, indem sie Aktinfilamente quervernetzen und über eine Vielzahl an Bindungsstellen wie z.B. eine PH-Domäne in  $\beta$ -Spectrin oder eine SH3-Domäne in  $\alpha$ -Spectrin, an Adapterproteinen binden, die wiederum multiple Interaktionen mit weiteren Faktoren aufnehmen können. Zu den bekanntesten Adapterproteinen gehören Ankyrin, Bande 4.1-Protein, Adducin und  $\alpha$ -Catenin. Sie vermitteln Interaktionen zu Zellmembranproteinen, wie Rezeptoren, Ionenkanälen und Zelladhäsionsmolekülen, wie auch zu intrazellulären Signalmolekülen, Aktinfilamenten und weiteren Komponenten des Cytoskeletts (Bennett and Baines, 2001; Bialkowska et al., 2005; De Matteis and Morrow, 2000).

In *Drosophila* ist die genetische Situation für Spectrine vergleichsweise einfach. Im Gegensatz zum Menschen gibt es hier nur eine  $\alpha$ -Untereinheit (Lee et al., 1993), eine konventionelle  $\beta$ -Untereinheit (Dubreuil et al., 2000) und eine unkonventionelle, schwerere  $\beta_{\text{Heavy}}$ -Untereinheit (Thomas et al., 1998).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spectrin sind mit jeweils etwa 60% Sequenzidentität zu den menschlichen Homologen in der Evolution stark konserviert. Die  $\beta_{\text{H}}$ -Untereinheit zeigt mit 34 % eine vergleichsweise schwache Homologie. Während  $\beta_{\text{H}}$ -Spectrin nur in epithelialen Geweben exprimiert ist (Thomas and Kiehart, 1994), zeigen  $\alpha$ - und  $\beta$ - Spectrin eine ubiquitäre Expression (Dubreuil et al., 2000; Lee et al., 1993).

An der Zellmembran epithelialer Zellen gibt es zwei Hauptpopulationen von Spectrin-Heterotetrameren. Das ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>-Spectrin Heterotetramer lokalisiert entlang der basolateralen Zellmembran (de Cuevas et al., 1996; Pesacreta et al., 1989), während ( $\alpha\beta_{\text{H}}$ )<sub>2</sub>-Spectrin an der apikalen Membran lokalisiert (Lee et al., 1997). Das

## Einleitung

basolaterale  $(\alpha\beta)_2$ -Heterotetramer kann dabei von dem L1-CAM homologen Zelladhäsionsmolekül Neuroglian an den Ort von Zell-Zell-Kontakten rekrutiert werden, wobei Ankyrin die Bindung von Spectrin an Neuroglian vermittelt. Zu diesen Zell-Zell-Kontakten wird auch die ebenfalls in Epithelien basolateral lokalisierende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase rekrutiert (Dubreuil et al., 1996; Dubreuil et al., 1997; Woods and Bryant, 1991).

Die gewebsspezifische Reduktion durch RNAi von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spectrin führt in den Synapsen der neuromuskulären Endplatte zu einer Fehllokalisierung der Zelladhäsionsmoleküle Neuroglian und Fasciclin II und es kommt zu einer Destabilisierung und schließlich Retraktion der Synapse (Pielage et al., 2005). Auch sind prä- und postsynaptische Marker in Spectrin Mutanten fehllokalisiert (Featherstone et al., 2001).

$\beta_{\text{H}}$ -Spectrin kolokalisiert mit DE-Cadherin in Adherens Junctions (Thomas and Williams, 1999; Thomas et al., 1998) und kann mit apikal lokalisierenden Proteinen wie Crumbs und Moesin interagieren (Medina et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Möglicherweise ist es an der Regulation der Membranoberfläche beteiligt (Williams et al., 2004).

Allerdings sind Mutanten in  $\beta_{\text{H}}$ -Spectrin semivital und überlebende Fliegen zeigen vergleichsweise milde Defekte im Flügel und im Auge (Thomas, 1998), so dass essentielle Funktionen in epithelialer Zellpolarität unwahrscheinlich sind. Dies wurde auch im Follikelepithel von Ovarien gezeigt (Zarnescu and Thomas, 1999). In  $\beta_{\text{H}}$ -Spectrin Klonen ist die Zellbewegung des Epithels und der Border Cells (engl.) beeinträchtigt, die Polarität der Zellen ist aber nach wie vor intakt (Zarnescu and Thomas, 1999).

Obwohl das Spectrin Cytoskelett durch seine polare Organisation und die Vielzahl der möglichen Interaktionspartner immer wieder in Zusammenhang mit Zellpolarität gebracht wurde (Dubreuil and Grushko, 1998; Knust, 2000; Lee et al., 1997; Tepass et al., 2001; Yeaman et al., 1999), konnte eine direkte Funktion in diesem Prozess bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Insgesamt gesehen scheint Spectrin vor allem als eine Art Proteinakkumulator zu fungieren, der verschiedene Proteine wie Zelladhäsionsmoleküle, Ionenkanäle und weitere Komponenten in ihrer Lokalisation an bestimmten Membranregionen stabilisiert (Pinder and Baines, 2000).

## 1.2.2 Entwicklung und Funktion der lateralen Glia

### 1.2.2.1 Kontrolle der Entwicklung der lateralen Glia durch *gcm*

Die lateralen Gliazellen werden durch die Expression der teilweise redundanten Gcm-Box Transkriptionsfaktoren *glial cells missing 1* und *2* determiniert (*gcm1*, *gcm2*) (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Kammerer and Giangrande, 2001; Shimizu et al., 2003; Vincent et al., 1996).

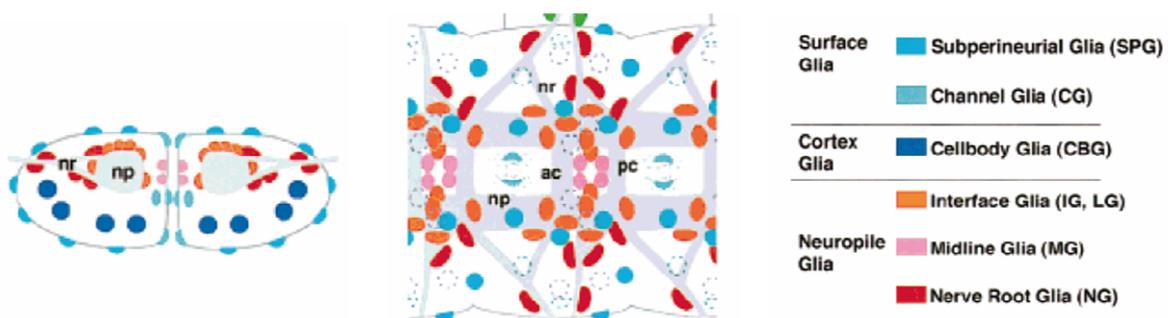
Der Ausfall von *gcm* führt dazu, dass sich prospektive Gliazellen neuronal differenzieren. Umgekehrt kann die Überexpression von Gcm auch neuronales Schicksal verhindern und stattdessen gliale Differenzierung einleiten (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995). Gcm fungiert in Neuroblasten und ihren Nachkommen als eine Art Masterregulator des glialen Schicksals und kann die Expression von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen, die für die terminale Differenzierung gebraucht werden, induzieren (Akiyama et al., 1996; Freeman et al., 2003; Giesen et al., 1997; Granderath et al., 2000; Granderath et al., 1999; Hosoya et al., 1995; Jones, 2005; Schreiber et al., 1998; Yuasa et al., 2003).

Zu den am besten untersuchten *gcm*-kontrollierten Genen gehören *pnt*, *tramtrack*, *repo* und *loco*. Dabei fördern die Transkriptionsfaktoren PntP1 und Repo die Expression von Genen, die für die terminale Differenzierung von lateralen Gliazellen benötigt werden, wie z.B. *loco* (Granderath et al., 2000; Halter et al., 1995; Klaes et al., 1994; Schwabe et al., 2005), während die Expression des Transkriptionsfaktors Tramtrack die neuronale Differenzierung reprimiert (Giesen et al., 1997). Es wurden noch weitere Gene identifiziert, die unter der Kontrolle von Gcm stehen (Egger et al., 2002; Freeman et al., 2003). Für einige (Draper, EAAT, Unc5) konnte bereits eine Rolle in der terminalen Gliaentwicklung gezeigt werden (Freeman et al., 2003) (Awasaki and Ito, 2004; Rival et al., 2004). Die meisten Gcm kontrollierten Gene sind aber bisher im Detail nicht untersucht.

### 1.2.2.2 Klassifizierung von Gliazellen des embryonalen ZNS

Am Ende der Embryogenese lassen sich drei Klassen von Gliazellen unterscheiden: die so genannten Surface-Glia (engl.), die an der Außenfläche des ZNS lokalisieren, Neuropilglia, die eng mit den Axontrakten assoziiert sind, und die Cortexglia, die im ZNS Cortex zwischen den Neuronen liegen (Hoyle, 1986; Ito et al., 1995; Klämbt and Goodman, 1991). Diese Klassen lassen sich nach Position und der Expression molekularer Marker weiter unterteilen (Abb. VI).

Das gesamte ZNS ist von sehr großen, flachen Perineurialzellen bedeckt. Da für diese Zellen ein mesodermaler Ursprung vermutet wurde und sie sich in der Morphologie von anderen Gliazellen unterscheiden, wurden sie in der Vergangenheit in der Regel nicht als echte Gliazellen klassifiziert (Carlson and Hilgers, 1998; Edwards et al., 1993; Ito et al., 1995). Neuere Untersuchungen lassen aber vermuten, dass es sich bei Perineurialzellen um eine Subpopulation der Surface-Glia handelt (Schwabe et al., 2005).



**Abb. VI: Klassifizierung der Gliazellen im embryonalen ZNS.** Schematische Karte der Lage der Gliazellen am Ende der Embryogenese. Links Querschnitt, rechts Dorsalansicht. nr: Nervenwurzel; np: Neuropil; ac: anterior Kommissur; pc, posteriore Kommissur. Die Perineurialzellen sind nicht dargestellt. Verändert nach (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Jones, 2001).

### 1.2.2.3 Funktion und terminale Differenzierung von Gliazellen

Insekten Gliazellen können während ihrer Entwicklung vielfältige Funktionen ausführen (Edenfeld et al., 2005; Oland and Tolbert, 2003). Sie haben Einfluss auf die axonale Wegfindung (Hidalgo et al., 1995; Jacobs, 2000; Klämbt et al., 1991; Pielage and Klämbt, 2001; Sepp et al., 2001), die Faszikulation von Axonen (Hidalgo and Brand, 1997) und die Kompartimentierung neuronaler Bereiche (Rossler et al., 1999; Younossi-Hartenstein et al., 2003). Neuron-Glia Interaktionen sind an der

## Einleitung

Justierung der Zellzahl in der Entwicklung des ZNS beteiligt (Booth et al., 2000; Hidalgo and French-Constant, 2003; Hidalgo et al., 2001; Younossi-Hartenstein et al., 2003) und überzählige Zellen können nach Apoptose durch Gliazellen phagocytotisch entfernt werden (Freeman et al., 2003; Sonnenfeld and Jacobs, 1995a). Auch spielen Glia eine aktive Rolle beim „Pruning“ von Axonen und können so Einfluss auf neuronale Schaltkreise haben (Awasaki and Ito, 2004; Watts et al., 2003).

Im reifen Nervensystem haben Gliazellen eine unterstützende Wirkung auf den neuronalen Stoffwechsel. So können sie große Mengen an Glykogen speichern und bei Bedarf Metabolite an Neuronen abgeben (Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Auch haben sie eine regulierende Wirkung auf die Menge aktiven Neurotransmitters, indem sie z.B. Glutamat von den Synapsen entfernen können (Rival et al., 2004; Soustelle et al., 2002). Gleichzeitig schützen sie so Neurone vor zu hohen Glutamatkonzentrationen, die langfristig zu neuronaler Degeneration führen können (Rival et al., 2004). Gliazellen exprimieren diverse Ionenkanäle mit denen sie wahrscheinlich die extrazelluläre Konzentration von Ionen regulieren können (Carlson and Saint Marie, 1990; Freeman et al., 2003). Eine weitere wichtige Funktion von Gliazellen ist, dass sie eine Diffusionsbarriere bilden, die so genannte „Blut-Hirn-Schranke“, die nur spezifische Metabolite und Ionen durchlässt (Carlson and Hilgers, 1998; Carlson et al., 2000; Edwards et al., 1993), so dass die Neurone vor den hohen  $K^+$ -Konzentrationen der Hämolymphe geschützt sind und die Weiterleitung von Aktionspotentialen gewährleistet bleibt (Auld et al., 1995; Carlson et al., 2000).

### **1.2.2.4 Septate Junctions und die Blut-Hirn-Schranke**

Es konnte gezeigt werden, dass *neurexin IV* und *gliotactin* Mutanten Defekte in ihrer Blut-Hirn-Schranke haben (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996). Die beiden Proteine sind Marker für pleated Septate Junctions in Epithelien und werden auch für die Bildung und Aufrechterhaltung der Septate Junctions benötigt (Baumgartner et al., 1996; Schulte et al., 2003). Diese Zell-Zell-Kontakte dienen auch in Gliazellen als parazelluläre Diffusionsbarriere und sind somit für die Blut-Hirn-Schranke essentiell (Carlson and Hilgers, 1998; Carlson et al., 2000). Es wurden allerdings sowohl für Subperineurialglia als auch für Zellen des Perineuriums pleated Septate Junctions zwischen den Zellen beschrieben, so dass zurzeit unklar ist, welche Zellen an der

## Einleitung

Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Carlson and Hilgers, 1998; Edwards et al., 1993; Schwabe et al., 2005; Tepass and Hartenstein, 1994).

### 1.3 Zielsetzung

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass in *klötzchen* Mutanten die Polarität der Mittellinienglia beeinträchtigt ist und dass dieser Effekt auf einen Verlust des  $\alpha$ -Spectrin Proteins zurückgeht (Pielage, 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von *klötzchen* in der Entwicklung der Mittellinienglia weiter untersucht werden. Da die molekulare Identität von *klötzchen* nicht eindeutig geklärt war, sollte die komplexe genetische Situation des  *$\alpha$ -spectrin/CG32315* Locus über eine EMS Mutagenese untersucht werden. Dabei sollte insbesondere analysiert werden, ob es sich bei dem im Intron von  *$\alpha$ -spectrin* liegenden Gen *CG32315* um *klötzchen* handelt. Weiterhin sollte die Rolle von  $\alpha$ -Spectrin und Proteinen, die mit dem Spectrin Cytoskelett assoziiert sind, in der Mittellinienglia Entwicklung analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

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

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

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

#### 2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Agarplatten	218 g Agar in 500 ml H <sub>2</sub> O autoklavieren, 150 ml H <sub>2</sub> O zugeben, aufkochen, 3 ml konz. Essigsäure zugeben
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
Church-Hybridisierlösung	0,5 M Church-Stammlösung, pH 7,2 7% SDS
Church-Stammlösung	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 7,2 einstellen.
Church-Waschlösung	40 mM Church-Stammlösung 1% SDS
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie R250 10% (v/v) Essigsäure

## Material und Methoden

Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) DEPC in H <sub>2</sub> O ü. N. lösen und autoklavieren
<i>Drosophila</i> Standardmedium (pro Liter Leitungswasser)	8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup hinzugeben, auf 60 °C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Esslöffel Nipagin hinzugeben
Ethidiumbromid	10 mg/ml (Stocklösung), davon 4µl/100ml Agarosegel
Heptankleber	Zerkleinertes Klebeband (Tesapack; Beiersdorff, Hamburg) wird in einer Weithalsflasche (500 ml) mit 150 ml Heptan überschichtet. Durch Schütteln (ca. 5 h) den Kleber in Heptan lösen. Den Überstand für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand als Kleber verwenden.
Gelladepuffer (10 x)	4 M Harnstoff 50% Saccharose 50 mM EDTA 1 Spatelspitze Xylencyanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Hybridisierlösung ( <i>in situ</i> )	100 µg/ml denaturierter Lachssperma in Hybridisierungspuffer

## Material und Methoden

Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 5xSSC, 0,1 % Tween 20
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA 1,5 µg Transposase-DNA (Laski et al., 1986) 1 µl Lebensmittelfarbe, 1,5 µl 10x Injektionspuffer ad 15 µl H <sub>2</sub> O
Injektionspuffer (10 x)	1 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), 50 mM KCl
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast Extract 10 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O, auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
LB-Agarplatten	20 g Agar/l Medium
Lysispuffer	0,1 M Tris pH 9 0,1 M EDTA 1 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
Natriumhypochloritlösung	ca. 12 % aktives Chlor (Aug. Hedinger, Heiligenwiesen) 1:1 mit H <sub>2</sub> O verdünnen.
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
Neomycin (G418) Lösung	25mg/ml in PBS lösen und mit roter Lebensmittelfarbe einfärben

## Material und Methoden

Neomycin Futtermedium für die FRT80B Insertion 0,1ml Neomycinlösung pro 10 ml Standardmedium einrühren

PBS  
130 mM NaCl  
7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,7 mM KCl (pH 7,6)

PBT 0,3 % Triton X-100 in PBS

Phosphatpuffer, 1 M, pH 7,4  
77,4 ml 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
22,6 ml 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ponceau S Färbelösung  
3% Essigsäure in Wasser  
0,3% Ponceau S

RNase-Wasser 0,2 µg/ml RNase in sterilem H<sub>2</sub>O

SB-Medium  
35 g Trypton  
20 g Yeast Extract  
5 g NaCl  
ad 1l H<sub>2</sub>O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

## SDS-Page

2 x SDS-Probenpuffer  
0,125 M Tris-Cl  
4 % SDS  
20 % Glycerin  
0,02 % Bromphenolblau  
0,2 M Dithiothreitol, auf pH 6,8 einstellen

4 x Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

4 x Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

## Material und Methoden

Sammelgel 4 % (10ml)	1,33 ml Acrylamid-Lösung 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer 0,1 ml 10 % SDS 6 ml H <sub>2</sub> O 100 µl 10 % APS 10 µl TEMED
Trenngel 10 % (30 ml)	10 ml Acrylamid-Lösung 7,5 ml 4 x Trenngelpuffer 0,3 ml 10 % SDS 12,1 ml H <sub>2</sub> O 200 µl 10 % APS 20 µl TEMED
Elektrodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS, auf pH 8,3 einstellen
SDS (10 %)	10 % Natriumdodecylsulfatlösung
SOC Medium	2 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> autoklavieren, dann auf 20 mM Glucose einstellen
SquiB	10 mM Tris, pH 8,2 1 mM EDTA 25 mM NaCl, frisch 200 µg/ml Proteinase K zugeben

## Material und Methoden

SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
STET-Puffer	8 % Saccharose 5 % Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
TBE	50 mM Tris/HCl, pH 8,2 50 mM Borsäure 5 mM EDTA
TBS/Tween 20	20 mM Tris/HCl, pH7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,2 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 129 mM Glycin 10% MetOH pH 8,2 - 8,4
Tris/HCl	1 M Trisbase mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen

### 2.1.3 Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Herkunft
pGEM T-Easy	T/A Klonierung von PCR Produkten	Stratagene
pCaSpeR4	P-Element Transformationsvektor	(Thummel and Pirrota, 1992)
pUAST	UAS P-Element Transformationsvektor	(Brand and Perrimon, 1993)
pMT V5-His B	Cu <sup>2+</sup> induzierbarer Expressionsvektor	Invitrogen
EGFP-C1	EGFP Klonierungs- und Expressionsvektor	Clontech

### 2.1.4 Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
JM109	Stratagene
XL1 blue	GIBCO/BRL

### 2.1.5 Primäre Antikörper

Bezeichnung	aus Spezies	Verdünnung	Referenz/Herkunft
anti-Patj	Kaninchen	1:400	(Tanentzapf et al., 2000)
anti-Cora	Maus	1:50	University of Texas Southwestern Medical School
anti-BdrU (B44)	Maus	1:100	Beckton-Dickinson
anti-Stranded at second	Kaninchen	1:500	(Schonbaum et al., 1992)
anti-Neurexin (1089)	Kaninchen	1:1000	(Baumgartner et al., 1996)
anti-Crumbs (Cq4)	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Armadillo (N2 7A1)	Maus	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank

## Material und Methoden

Bezeichnung	aus Spezies	Verdünnung	Referenz/Herkunft
BP102	Maus	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Wrapper (10D3)	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti- $\alpha$ -Spectrin (3A9)	Maus	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Discs large (4F3)	Maus	1:30	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Elav (7E8A10)	Ratte	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Repo (8D12)	Maus	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-GFP	Kaninchen	1:1000	Molecular Probes
anti-GFP	Mouse	1:1000	Molecular Probes
anti- $\beta$ -Galaktosidase	Kaninchen	1:5000	Cappel
anti- $\beta$ -Galaktosidase	Maus	1:1000	Promega
anti-HRP-FITC	Ziege	1:200	Dianova
anti-HRP-Cy5	Ziege	1:200	Dianova
anti-Discs lost (N1) (anti-CG32315)	Kaninchen	1:300	(Pielage et al., 2003)
anti-CD2	Maus	1:1000	Serotec
anti-MYC	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotech.
anti-MYC (9E10)	Maus	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank

### 2.1.6 Sekundäre Antikörper

Spezifität	aus Spezies	Konjugation	Verdünnung	Quelle
anti-Maus	Ziege	HRP oder alkalische Phosphatase	1:1000	Dianova
anti-Kaninchen	Ziege	HRP oder alkalische Phosphatase	1:1000	Dianova

Spezifität	aus Spezies	Konjugation	Verdünnung	Quelle
anti-Maus	Ziege	Alexa 488, Alexa 568 oder Alexa 647	1:500	Molecular Probes
anti-Ratte	Ziege	Alexa 568	1:500	Molecular Probes
anti-Digoxigenin	Ziege	alkalische Phosphatase	1:1500	Roche

## 2.1.7 Verwendete Fliegenstämme

### 2.1.7.1 Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>w</i> <sup>1118</sup>	<i>white</i> <sup>-</sup> , sonst wildtypisch	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>st e</i>	Chromosom für die Mutagenese	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>FM7C</i> <sup>bb</sup> <i>P[ry+,ftz-lacZ]</i>	Balancer X Chromosom	Hiromi, unveröffentlicht
<i>brk</i> <sup>F124</sup> <i>w /FM7C P[ry+,ftz-lacZ]</i> , <i>TM3</i> <sup>bb</sup> <i>Sb P[ry<sup>+</sup>,ftz-lacZ]/Scr e</i>	Doppelbalancer X/III. Chromosom	Lammel, unveröffentlicht
<i>TM3</i> <sup>bb</sup> , <i>Sb P[ry<sup>+</sup>,ftz-lacZ]/Scr e</i>	Balancer III. Chromosom	Bloomington
<i>y w N/FM7C P[wGAL4-twi.G]</i> , <i>P[UAS-2xEGFP]</i>	GFP Balancer X Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>w ; ; TM3 Sb Ser e P[wGAL4-twi.G]</i> , <i>P[UAS-2xEGFP]</i>	GFP Balancer III. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>CyO P[ry<sup>+</sup>, ftz-lacZ]</i>	Balancer II. Chromosom	Hiromi, unveröffentlicht

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>TM3 Sb e P[ry<sup>+</sup>, ftz-lacZ]</i>	Balancer III. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>MKRS, Sb</i>	Balancer III. Chromosom	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>TM2 e Ubx</i>	Balancer III. Chromosom	(Lindsley and Zimm, 1992)
<i>TM6 Tb Hu e P[w<sup>+</sup>, Ubx-lacZ]</i>	Balancer III. Chromosom	Vässin, unveröffentlicht
<i>Cyo<sup>bb</sup> P[w<sup>+</sup>, elav-lacZ]</i>	Balancer III. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w-; CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	Doppelbalancer II./III. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w-; ; TM3 Sb e/TM6B Hu Tb e</i>	Doppelbalancer III. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht

### 2.1.7.2 Verwendete Mutationen, Defizienzen und Enhancer trap Linien

Stamm	Beschreibung/Gen	Referenz/Herkunft
<i>cyclinE<sup>AR95</sup></i>	Nullallel	(Knoblich et al., 1994)
<i>coracle<sup>k08713</sup></i>	P Insertion in <i>coracle</i>	Bloomington
<i>w<sup>1118</sup>; ; P[EP(3)3081]</i>	EP Insertion 5' von CG13933	(Rorth, 1996)
<i>w<sup>1118</sup>; ; P[kloP1]</i>	EP Insertion in <i>α-spectrin</i>	(Pielage et al., 2003)
<i>w<sup>1118</sup>; ; P[kloP2]</i>	EP Insertion in <i>α-spectrin</i>	(Pielage et al., 2003)
<i>w<sup>1118</sup>; ; P[kloP3]</i>	Defizienz von <i>α-spectrin</i>	(Pielage et al., 2003)
<i>w<sup>1118</sup>; ; P[kloP4]</i>	EP Insertion in <i>α-spectrin</i>	(Pielage et al., 2003)
<i>Df(3L)My10</i>	Defizienz im Bereich von <i>α-spectrin</i> und <i>patj</i>	(Bhat et al., 1999)
<i>P[dlt<sup>595/4</sup>]</i>	P Insertion in <i>α-spectrin</i>	(Bhat et al., 1999)
<i>discs lost<sup>dre-1</sup>e</i>	EMS	(Sliter et al., 1989)
<i>Df(3L)Aprt32</i>	Defizienz der <i>aprt</i> Region	(Wang et al., 1994)
<i>cdc37<sup>E8sev)3B</sup></i>	EMS Allel	(Cutforth and Rubin, 1994)

## Material und Methoden

Stamm	Beschreibung/Gen	Referenz/Herkunft
<i>klötzchen</i> <sup>D4-65</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	(Hummel et al., 1999a)
<i>klötzchen</i> <sup>E2-25</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	(Hummel et al., 1999a)
<i>klötzchen</i> <sup>N2-141</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	(Hummel et al., 1999a)
<i>klötzchen</i> <sup>D4-65</sup> <i>h th e st cu sr ca</i>	EMS Allel rekombiniert gegen „ <i>ru cu ca</i> “	Diese Arbeit
<i>klötzchen</i> <i>E2-26</i> <sup>gereinigt</sup>	EMS Allel rekombiniert gegen „ <i>ru cu ca</i> “ und nochmals gegen wt	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>A-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>C-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>N-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>O-2</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>no name yet</i> <sup>O-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>no name yet</i> <sup>S-2</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>no name yet</i> <sup>U-2</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>no name yet</i> <sup>V-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>P-1 st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>V-4 st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>rg41</sup> <i>ru e</i>	Röntgenstrahlen Allel	(Lee et al., 1993)
<i>α-spectrin</i> <sup>rg35</sup> <i>ru e</i>	Röntgenstrahlen Allel	(Lee et al., 1993)
<i>α-spectrin</i> <sup>E-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>F-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	(Lee et al., 1993)
<i>α-spectrin</i> <sup>F-2</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>J-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>N-2</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>P-2</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>S-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>U-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>HR-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit
<i>α-spectrin</i> <sup>KR-1</sup> <i>st e</i>	EMS Allel	Diese Arbeit

Stamm	Beschreibung/Gen	Referenz/Herkunft
$\alpha$ -spectrin <sup>1.1</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.2.1</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.2.2</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.3</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.4.1</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.4.2</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.7</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>2.4.1</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>2.4.3</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>2.6.1</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>2.6.2</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>2.7.3</sup> st e	EMS Allel	Diese Arbeit

### 2.1.7.3 Verwendete FRT Chromosomen

Stamm	Referenz/Herkunft
$ry^{506}$ FRT80B	Bloomington
$P[w^+]$ 70C FRT80B	Bloomington
$\alpha$ -spectrin <sup>rg41</sup> ru FRT80B	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>F-1</sup> FRT80B	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>N-2</sup> FRT80B	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>P-2</sup> FRT80B	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>S-1</sup> FRT80B	Diese Arbeit
$\alpha$ -spectrin <sup>1.3</sup> FRT80B	Diese Arbeit
klötzchen <sup>D4-65</sup> FRT80B	(Pielage et al., 2003)
klötzchen <sup>N2-141</sup> FRT80B	(Pielage et al., 2003)
klötzchen <sup>E2-66</sup> FRT80B	(Pielage et al., 2003)
$w^{1118}$ ; ; $P[kloP3]$ FRT80B	Diese Arbeit
$Df(3L)My10$ FRT80B	(Tanentzapf et al., 2000)

Stamm	Referenz/Herkunft
<i>discs lost</i> <sup>A-1</sup> <i>FRT80B</i>	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>C-1</sup> <i>FRT80B</i>	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>N-1</sup> <i>FRT80B</i>	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>O-2</sup> <i>FRT80B</i>	Diese Arbeit
<i>discs lost</i> <sup>dre-1</sup> <i>FRT80B</i>	Diese Arbeit

#### 2.1.7.4 Weitere Stämme zur Generierung von mitotischen Klonen

Fliegenstämme	Herkunft/Referenz
<i>hsFLP w, Sp/CyO; P[ovo<sup>D1</sup>] FRT80B/TM6B</i>	(Chou and Perrimon, 1996), Jan Pielage
<i>hsFLP w; Sp/CyO, TM2/TM6B</i>	Bloomington; Jan Pielage
<i>hsFLP w; ; ubi-nlsGFP FRT80B</i>	Bloomington; diese Arbeit
<i>hsFLP y w; ; P[arm-lac]; Z]70C FRT80B</i>	Bloomington
<i>eyFLP w P[GMR-lacZ]; ; rsp17<sup>A</sup> P[w+]70C FRT80B</i>	Bloomington
<i>eyFLP w ; ; ubi-nlsGFP FRT80B</i>	Bloomington; diese Arbeit

#### 2.1.7.5 Rettungskonstrukte und GFP Linien

Stamm	Beschreibung/Gen	Chromosom	Referenz/Herkunft
<i>P[ubi-<math>\alpha</math>-spectrin]</i>	<i><math>\alpha</math>-spectrin</i> Minigen	X	(Lee et al., 1993)
<i>P[ubi-CG32315]</i>	<i>discs lost</i> Minigen	II.; III.	(Pielage et al., 2003)
<i>P[cdc37]</i>	genomisches <i>cdc37</i> Fragment	II.	(Cutforth and Rubin, 1994)
Linie 454	<i>neurexin IV</i> GFP trap	III.	(Peitz, 2005)
MT-EGFP	<i>metallothioneinA</i> Promotor Fusion mit EGFP ORF	X, II, III	Diese Arbeit

### 2.1.7.6 GAL4 Treiberlinien

Stamm	Expressionsmuster/ Promotor	Insertion/ Chromosom	Referenz/Herkunft
<i>ey-GAL4</i>	<i>eyeless</i>	II.	Bloomington Stock Center
<i>elav-GAL4</i>	<i>elav</i>	X bzw. III.	(Lin and Goodman, 1994)
<i>repo-GAL4</i>	<i>reversed polarity</i>	III.	(Sepp et al., 2001)
<i>da-GAL4</i>	<i>daughterless</i>	III.	(Wodarz et al., 1995)
<i>arm-GAL4</i>	<i>armadillo</i>	II.	Bloomington Stock Center
<i>rho-GAL4</i>	<i>rhomboid</i>	III.	Ip and Levine, unveröffentlicht
<i>slit-GAL4</i>	<i>slit</i>	II. bzw. III.	(Klämbt et al., 1996)
<i>en-GAL4</i>	<i>engrailed</i>	III.	Bloomington Stock Center
<i>ptc-GAL4</i>	<i>patched</i>	II.	Bloomington Stock Center

### 2.1.7.7 UAS Effektorlinien

Stamm	Beschreibung/Gen	Insertion/ Chromosom	Referenz/Herkunft
<i>UAS-CG32315</i>	<i>discs lost</i>	II bzw. III	(Pielage, 2002)
<i>UAS-CG32315MYC</i>	<i>discs lost</i> mit MYC- Tag	II. bzw. III	(Stork, 2002)
<i>UAS <math>\alpha</math>-spectrin*</i>	nicht funktionelles $\alpha$ -Spectrin Protein	X, II., III.	Diese Arbeit
<i>UAS string</i>	<i>string</i>	III.	(Neufeld et al., 1998b)
<i>UAS CycA-HA</i>	<i>cyclinA</i> mit HA-Tag	II.	(Grosskortenhaus and Sprenger, 2002)
<i>UAS CycE</i>	<i>cyclin E</i>	II. bzw. III.	(Lane et al., 1996)
<i>UAS dmyc</i>	<i>myc</i>	II.	(Zaffran et al., 1998)
<i>UAS P35</i>	<i>P35</i>	II.	(Hay et al., 1994)
<i>UAS lamGFP</i>	<i>lamin GFP</i>	II. bzw. III.	Bloomington Stock Center
<i>UAS cd8GFP</i>	Transmembran- domäne von CD8	II.	Bloomington Stock Center
<i>UAS 2XEGFP</i>	cytoplasmatisches EGFP	II.	Bloomington Stock Center

Stamm	Beschreibung/Gen	Insertion/ Chromosom	Referenz/Herkunft
<i>UAS actin-GFP</i>	<i>actin 5c</i> GFP	II.	Bloomington Stock Center
<i>UAS tau-GFP</i>	<i>tau</i> GFP	II.	(Wolf et al., 2002)
<i>UAS nlsGFP</i>	nukleäres GFP	III.	Bloomington Stock Center
<i>UAS gap-GFP</i>	myristoyliertes GFP	II.	Bloomington Stock Center
<i>UAS myr-RFP</i>	myristoyliertes GFP	II. bzw. III.	Bloomington Stock Center
<i>UAS actin-CFP</i>	<i>actin 5c</i> CFP	II.	(Van Roessel et al., 2002)
<i>UAS dlg-A GFP</i>	<i>dlg-A</i> GFP	II.	(Koh et al., 1999)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Genetische Methoden

Alle Fliegenstämme wurden, wenn nicht anders angegeben auf *Drosophila* Futtermedium in Standardplastikröhrchen bei 25°C, 18°C oder Raumtemperatur gehalten. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte jungfräuliche Weibchen (< 10h nach Verlassen des Pupariums bei 18 °C) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

#### 2.2.1.1 Sammeln von Embryonen

Für Einzel-Eiablagen wurden die Fliegen in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Agarplatte verschlossen wurde. Diese wurde zuvor mit etwas frisch angerührter Bäckerhefe bestrichen. Die Agarplatte wurde alle 12 h gewechselt und bis zu 2 Tage auf 4°C gesammelt.

#### 2.2.1.2 Keimbahntransformation

Zur Keimbahntransformation wurde ein Eppendorf FemtoJet eingesetzt. Für die Injektionen wurden Glaskapillaren (Typ GC100-10, Harvard Apparatus, England) mit einem Nadelziehgerät (Narishighe, Japan) ausgezogen und vor Gebrauch im Winkel von ca. 30° nachgeschliffen. Vor dem Einsetzen in das Injektionssystem wurde die Kapillare mit 4 µl Injektionsmix befüllt.

### 2.2.1.2.1 Präparation der Embryonen

$w^{1118}$  Fliegen wurden auf Agarplatten zur Ablage gesetzt. Die Platten wurden ein- bis zweimal pro Stunde gewechselt und die Embryonen direkt zur Injektion verwendet. Zur Dechorionisierung wurden die Embryonen in 6% Natriumhypochlorid für 3 min inkubiert, gründlich mit Wasser gewaschen und auf einen Agarblock transferiert. Dort erfolgte die einheitliche Ausrichtung der Embryonen mit einer Präpariernadel. Sie wurden anschließend mit einem mit Heptankleber beschichteten Deckglas aufgenommen und bis zu einem kritischen Punkt getrocknet. Dieser Punkt ist erreicht, wenn die Vitellinmembranen auf leichten Druck mit der Präpariernadel hin Falten werfen. Die Embryonen wurden mit 10S Öl (Votalef) überschichtet und für die Injektion verwendet.

### 2.2.1.2.2 Injektion der Embryonen

Embryonen und Injektionskanüle wurden an einem Mikroskop in einer Ebene ausgerichtet. Injektionen erfolgten nur in Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm Stadium befinden. Die Kanüle wird in den posterioren Pol des Embryos gestochen und durch Betätigung der Injektionstaste des Transjektors wurde eine kleine Menge des Injektionsmixes in den Embryo injiziert. Die erfolgreiche Injektion konnte anhand der roten Farbe des Injektionsmixes nachvollzogen werden. Nach der Injektion wurde das Deckglas in ein Wägeschälchen überführt und mit 3S Öl (Votalef) überschichtet. Die Embryonen wurden bis zum Schlüpfen bei 18°C gehalten. Geschlüpfte L1 Larven wurden mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila* Standardmedium überführt.

### 2.2.1.2.3 Selektion transgener Fliegen

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

### 2.2.1.2.4 Lokalisation der Insertionen

Zur Bestimmung des Chromosoms, auf dem die Insertion stattgefunden hat, wurden die Transgene erneut gegen Doppelbalancer gekreuzt. Anhand der Segregation der

dominanten Marker und der  $w^+$  Markierung der transgenen Fliegen konnte das Chromosom, das die Insertion des jeweiligen Konstruktes trägt, identifiziert werden.

### 2.2.1.3 Generierung von somatischen Klonen mittels FRT/FLP Technik

#### 2.2.1.3.1 Generierung von FRT 80B Rekombinanten

Um FRT 3L Chromosomenarme der verschiedenen Mutationen zu generieren, wurden  $w^-$ ; FRT80B  $P[w^+]$  70C Tiere gegen die entsprechenden mutanten Chromosomen gekreuzt. Etwa 20 FRT80B  $P[w^+]$  70C/*mutationX* transheterozygoten jungfräuliche Weibchen wurden gegen TM3/TM6B Männchen gekreuzt und auf Neomycin Futter (25µg G418/1ml) gesetzt. Da die FRT Sequenz eine Neomycin Resistenz enthält, sollten nur Nachkommen überleben, die die FRT 80B Insertion tragen. Aus diesen wurden weißäugige Männchen selektioniert und in Einzelkreuzungen (mindestens 20) gegen ein vom eingesetzten Ausgangschromosom verschiedenes Allel der Komplementationsgruppe *mutationX* komplementiert. Für nicht komplementierende Chromosomen wurden nochmals Testkreuzungen gegen den *eyFLP w P[GMR-lacZ]; ; rsp17<sup>A</sup> P[w+] 70C FRT80B* Stamm gekreuzt, um zu testen, ob sich Klone induzieren lassen.

#### 2.2.1.3.2 Generierung von mutanten Klonen in der Augenimaginalscheibe mittels *eyFLP*

Die  $w^-$ ; ; FRT 80B *mutanteX/TM6B Hu Tb* Tiere wurden gegen *eyFLP w P[GMR-lacZ]; ; rsp17<sup>A</sup> P[w+] 70C FRT80B/TM6B Hu Tb* gekreuzt und die Individuen, in denen somatische Klone entstehen können, wurden über die Abwesenheit des TM6B *Hu Tb* Balancers identifiziert. Mutante Klone im adulten Auge konnten an der Abwesenheit des *white<sup>+</sup>* Markers im Auge erkannt werden.

#### 2.2.1.3.3 Generierung von mutanten Klonen mittels *hsFLP*

Um Klone mittels *hsFLP* zu generieren, wurden  $w^-$ ; ; FRT 80B *mutanteX/TM6B Hu Tb* Tiere gegen *hsFLP w; ; ubi-nlsGFP FRT80B, hsFLP y w; ; P[arm-lac]; Z]70C FRT80B* oder *hsFLP w, Sp/CyO; P[ovoD2] FRT80B/TM6B* gekreuzt.

## Material und Methoden

Für unterschiedliche Zwecke wurden die Nachkommen dieser Kreuzungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einem 38°C Hitzeschock in einem Wasserbad ausgesetzt.

Für die Generierung somatischer Klone in L3 Larven, wurde der Stamm *hsFLP y w; ; P[arm-lacZ]; Z] 70C FRT80B* eingesetzt. Von den Kreuzungen (mindestens 20 jungfräuliche Weibchen) wurden für einen Tag Embryonen gesammelt, diese alterten einen oder zwei Tage. Dann wurde für eine Stunde ein Hitzeschock bei 38°C gegeben. Die L3 Larven wurden analysiert. Dabei konnten mutante Klone über die Abwesenheit der  $\beta$ -Galaktosidase identifiziert werden.

### Keimbahnklone

Für die Generierung von Keimbahnklonen wurden *w; ; FRT 80B  $\alpha$ -spectrin<sup>AllelX</sup>/TM6B Hu Tb* Weibchen gegen *hsFLP w, Sp/CyO; P[ovo<sup>D1</sup>]* FRT80B/TM6B Männchen gekreuzt. Die L2 und frühe L3 Larven der F<sub>1</sub>-Generation wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils einem Hitzeschock von 2 Stunden ausgesetzt. Es wurden dann ca. 50 adulte Weibchen mit dem Genotyp: FRT 80B  *$\alpha$ -spectrin<sup>AllelX</sup>/hsFLP w/+;Sp oder CyO ; FRT 80B/P[ovo<sup>D1</sup>]* FRT80B gegen  *$\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup>/TM6B<sup>P[Ubx-lacZ]</sup>* gekreuzt und die Nachkommen analysiert. Anhand der  $\beta$ -Galaktosidase Expression konnte zwischen Keimbahnklonen unterschieden werden, die durch ein paternales, wildtypisches Chromosom gerettet wurden und denen, die sowohl maternal und zygotisch mutant waren.

### Somatische Klone im Follikelepithel

Um somatische Klone im Follikelepithel der Ovarien zu induzieren, wurden *hsFLP w/+; ; ubi-*nl*sGFP FRT80B/FRT 80B mutanteX* Weibchen 2-3 Tage nach dem Schlüpfen einem Hitzeschock bei 38°C im Wasserbad für eine Stunde ausgesetzt und die Ovarien 4-6 Tage später analysiert.

## 2.2.1.4 Zellstress Experimente

### 2.2.1.4.1 Kältestress für Embryonen

Die gesammelten Embryonen unterschiedlicher Stadien wurden für Kältestress Experimente für 24 Stunden oder 48 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und anschließend für Antikörperfärbungen fixiert

#### 2.2.1.4.2 Kältestress in Larven und Puppen

Die *eyFLP w P[GMR-lacZ]; ; rsp17<sup>A</sup> P[w+] 70C FRT80B/FRT 80B  $\alpha$ -spectrin<sup>AllelX</sup>* Larven (siehe Abschnitt 1.2.1.3.2) wurden ab dem L1 Stadium bis zum Erreichen des „Pharate“ Stadiums täglich für 1h im Kühlschrank bei 4°C gelagert und der Augenphänotyp in den geschlüpften Tieren untersucht.

#### 2.2.1.4.3 Hitzeschocks in Embryonen

Embryonen die 0-2 Stunden alt waren, wurden weiter bei 25° inkubiert bis etwa 40-50% der Embryonalentwicklung (ca. Stadium 13/14) erreicht waren. Sie wurden dann einem Hitzeschock von 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt und nach zwei weiteren Stunden bei 25°C (etwa im Stadium 16) fixiert und einer Antikörperfärbung unterzogen.

#### 2.2.1.4.4 UV-Stress Embryonen

Embryonen die 0-2 Stunden alt waren, wurden weiter bei 25° inkubiert bis etwa 40-50% der Embryonalentwicklung (ca. Stadium 13/14) erreicht waren. Sie wurden dann dechorionisiert, in PBS auf einer Agarplatte so ausgebreitet, dass die Embryonen nicht übereinander lagen und mit Hilfe des UV-Stratalinkers (Stratogene) mit 500 mJ/cm<sup>2</sup> UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) bestrahlt (Zhou and Steller, 2003). Nach zwei weiteren Stunden bei 25°C wurden die Embryonen (etwa im Stadium 16) fixiert und einer Antikörperfärbung unterzogen.

#### 2.2.1.5 EMS Mutagenese

3 bis 4 Tage alte, Männchen eines homozygoten isogenisierten Stammes wurden mit einer 25 mM Ethylmethansulfonat (EMS) Lösung nach Standardmethoden behandelt (Ashburner, 1989). Die mutagenisierten Männchen wurden gegen TM3/TM6B jungfräuliche Weibchen gekreuzt. Diese Kreuzung wurde bei 25 °C vier Tage lang jeden Tag auf frisches *Drosophila* Medium gesetzt und die Parentalgeneration danach verworfen. Aus der F1 Generation wurden einzelne TM6B balancierte Männchen gegen die Testerstämme *P[kloP1]/TM6B<sup>bb</sup>*, *P[kloP2]/TM6B<sup>bb</sup>*, *P[kloP3]/TM6B<sup>bb</sup>* *P[kloP4]/TM6B<sup>bb</sup>* (6000 Kreuzungen) und  *$\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup>  $\Delta$ 381/TM6B<sup>bb</sup>* (6000 Kreuzungen) gekreuzt und nicht komplementierende Chromosomen anhand des pupalen Markers *Tubby (Tb)* identifiziert. Diese mutagenisierten Chromosomen wurden über einem TM6B<sup>bb</sup> Balancer etabliert.

## 2.2.2 Histologische Methoden

### 2.2.2.1 Antikörperfärbungen

#### 2.2.2.1.1 *whole mount* Antikörperfärbung von Embryonen

Die Fixierung und Färbung von Embryonen aus Einzel-Eiablagen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt
- Dechorionisierung mit 6 % NaOCl für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser (ca. 5 min)
- Trocknen auf Papierhandtüchern
- Überführen der MWP in Heptan
- Überführen der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zugabe des gleichen Volumens (etwa 500 µl) an Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wässrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- Devitellinisierung der Embryonen durch kräftiges Schütteln für ca. 20 sek
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurzes Schütteln
- Abnahme des Methanols und einmaliges Waschen mit 96 % Ethanol
- Waschen der Embryonen dreimal kurz und dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation in 10 % Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation des primären AK (Antikörper) in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT ü. N. bei 4 °C auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz und dreimal 20 min. mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10 % GS/PBT für 2-3 h bei RT auf einem Schüttler
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT und dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT

### **2.2.2.1.2 Antikörperfärbung an L3 Imaginalscheiben**

Mit zwei Pinzetten wurde am Mundhaken bzw. am hinteren Ende des vorderen Drittel einer L3 Larve angesetzt und die Larve vorsichtig auseinander gezogen, so dass der Mundhaken samt Gehirn und den meisten Imaginalscheiben (IS) präpariert werden konnte. Die so präparierten Scheiben wurden bis zur Weiterverarbeitung nicht länger als 20 min auf Eis in PBS gesammelt.

- Überführen der IS in Reaktionsgefäße mit Fixans (4 % Formaldehyd/PBS)
- Fixierung in 4 % Formaldehyd/PBS für 20-30 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme des Fixans und Waschen dreimal kurz mit PBS
- Waschen dreimal für 20 min in PBT auf einem Schüttler
- Fortführung des Protokolls siehe Antikörperfärbung an Embryonen (ab:  
Inkubation in 10% GS/PBT)

### **2.2.2.1.3 Antikörperfärbung an Ovarien**

Die Ovarien werden mit Pinzetten aus dem Abdomen der Weibchen präpariert. Dabei werden die einzelnen Ovariolschläuche vorsichtig ausgebreitet ohne sie von der Basis abzureißen. Die Ovarien werden in PBS auf Eis gesammelt und dann in 4% Formaldehyd für 30 min fixiert, wie dies für Imaginalscheiben beschrieben wurde. Bei anschließender Verwendung der Antikörper anti-Crumbs oder anti-Armadillo wurde statt mit 4% Formaldehyd mit 8% Formaldehyd fixiert.

### **2.2.2.2 *in-situ* Hybridisierung an L3 Imaginalscheiben**

Fixierung der Imaginalscheiben wie beschrieben (siehe oben). Als Fixans werden aber 8% Formaldehyd/PBS für 40 min eingesetzt. Protokoll weitgehend nach (Tautz and Pfeifle, 1989).

#### Hybridisierung

- 2 x 5 min mit PBT waschen
- IS in 95° - 100° heißem Wasser 3 min inkubieren, dabei 2-3 Mal invertieren
- 15 min auf Eis inkubieren
- 2 x kurz mit PBT waschen
- 20 min in 5% Formaldehyd/PBT fixieren (2. Fixierung)
- 3 x 2 min waschen mit PBT

## Material und Methoden

- 5 min Waschen mit PBT/Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1
- 5 min Waschen mit Hybridisierungspuffer
- Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei 50 °C für mind. 80 min
- RNA-Probe in 30 µl Hybridisierungslösung für 2 min bei 90° denaturieren, direkt auf Eis stellen
- alte Hybridisierungslösung abnehmen
- Zugabe der denaturierten RNA-Probe zu den Embryonen, Inkubation bei 50-60 °C ü. N.
- 30 min in Hybridisierungspuffer bei 50 °C waschen
- 30 min in Hybridisierungspuffer/PBT bei 50 °C waschen
- 5 x 20 min in PBT bei 50 °C waschen
- 10 min in PBT bei RT waschen
- Inkubation mit anti-Digoxigenin-AP Antikörper/PBT (1:2000) für 2 h
- 5 x 10 min in PBT bei RT waschen

## Nachweisreaktion

- 2 x 5 min in NBT-Puffer waschen
- Embryonen in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT-Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist
- 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen.
- Imaginalscheiben werden in 70% Glycerin freipräpariert.

Von Beginn der Hybridisierung bis zum Stoppen der Färbereaktion wird DEPC-PBT, DEPC-PBS und DEPC-NBT Puffer verwendet.

### **2.2.2.3 Antikörperspezifische Nachweisreaktion**

#### **2.2.2.3.1 Alkalische Phosphatase (AP) Färbung**

Zur Entwicklung einer AP-vermittelten Reaktion wurde folgendes Protokoll angewandt:

- Waschen der Embryonen zweimal 5 min in NBT Puffer auf einem Schüttler
- Inkubation in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT-Puffer
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht

## Material und Methoden

- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Überführen der Embryonen in 70 % Glycerin

### 2.2.2.3.2 Meerrettichperoxidase (HRP) Färbung

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

### 2.2.2.4 Präabsorption des anti- β-Galaktosidase Antikörpers

- Fixierung von Embryonen wie bei der whole mount Antikörperfärbung
- Waschen der Embryonen dreimal kurz mit PBT
- Waschen der Embryonen dreimal 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT
- Inkubation in 10% GS/PBT für 1 h bei RT auf einem Schüttler
- Inkubation des anti- β-Galaktosidase AK (Verdünnung 1:500) in 10 % GS/PBT ü. N. bei 4 °C auf einem Schüttler
- Sterilfiltration des Überstandes, anschließende Lagerung bei 4 °C lagern (größere Aliquots bei -20 °C einfrieren)

### 2.2.2.5 Bestimmung der Hämocytenanzahl in L3 Larven

Die L3-Larve wurde in PBT gründlich abgespült und auf einen Objektträger mit 20µl PBS transferiert. Hier wurde der Hautmuskelschlauch aufgezipft ohne andere Gewebe wesentlich zu verletzen, so dass die Hämolymphe austreten konnte. Die Larve wurde entfernt und 5µl Trypanblau (0,4%) zugegeben. Diese Lösung wurde vom Objektträger in eine Thomakammer transferiert und die Hämocytenzahl in vier Großquadranten ausgezählt. Dies wurde für 20 Wildtyp und 20 *discs lost*<sup>C-1</sup> Larven durchgeführt.

### **2.2.2.6 BrdU Markierung**

- Präparation von Imaginalscheiben samt Gehirn und Mundhaken
- Scheiben 45 in 10mM 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) in PBS bei RT inkubieren
- Scheiben für 30 min mit 4% Formaldehyd in PBS fixieren
- 5X kurz waschen mit PBT
- denaturieren der DNA mit 2 N HCl
- neutralisieren durch mehrmaliges Waschen mit eiskaltem PBT
- Inkubation mit anti-BrdU Antikörper über Nacht bei 4 °C
- Nachweis über sekundäre Antikörper wie beschrieben

### **2.2.2.7 Acridin Orange Färbung**

Die Imaginalscheiben wurden präpariert wie beschrieben und 5 Minuten in einer Acridin Orange Lösung (2 $\mu$ M in PBS) für 5 min inkubiert. Die Lösung wird abgenommen und gegen PBS ausgetauscht. Die Scheiben werden dann vorsichtig in PBS auf einem Objektträger mit einem Deckgläschen mit Füsschen eingebettet und innerhalb von 10 min analysiert. Die Auswertung erfolgte an einem Standard Fluoreszenzmikroskop mit einem Standard FITC oder GFP Filter.

### **2.2.2.8 Injektion CuSO<sub>4</sub>**

Für die Injektionen von CuSO<sub>4</sub> wurden Embryonen im Stadium 17 der MT-EGFP Linie 10-3 (diese Arbeit) verwendet. Sie wurden, wie für die Keimbahntransformation beschrieben, auf Deckgläschen aufgeklebt und mit Voltalef 10S Öl überschichtet. Von posterior wurde eine 50mM CuSO<sub>4</sub> Lösung oder als Kontrolle PBS injiziert. Nach fünf Stunden wurde das GFP Signal mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM510) detektiert.

### **2.2.2.9 *in vivo* Zeitrafferaufnahmen**

Die GFP exprimierenden Embryonen wurden an einer Fluoreszenz-Lupe (Leica Fluo) mit einem Standard GFP Filter vorselektioniert, auf einem Agarblock aufgereiht und ausgerichtet und schließlich wie beschrieben auf ein Deckgläschen geklebt. Dieses Deckgläschen wurde in einen objektträgergroßen Aluminiumrahmen geklebt und mit Voltalef 10S Öl überschichtet. Die Embryonen wurden dann an einem inversen Mikroskop über ein konfokales Spinning Discs Mikroskop (Ultraview RS, Perkin

Elmer) analysiert. Um Phototoxizität zu minimieren wurden die niedrigst möglichen Werte für die Laserleistung und die Expositionszeit gewählt.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde

Für die Markierungsreaktion wurden in ein eisgekühltes Reaktionsgefäß gegeben:

- 1 µg linearisierte Plasmid DNA (mit RNA Polymerasepromotoren)
- 2µl 10 x DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- 2µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)
- ad 18 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O
- 2µl RNA Polymerase (T7 oder T3) (Roche)

Nach kurzem Mischen und Abzentrifugieren folgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C. Anschließende Behandlung mit DNase, das Abstoppen der Reaktion sowie die Fällung der DNA wurde wie im Folgenden aufgelistet durchgeführt:

- Zugabe von 2 µl DNaseI, RNase-frei zur Entfernung der Template-DNA
- Inkubation für 15 min bei 37 °C inkubiert
- Abstoppen der Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0
- Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl EtOH (gekühlt bei -20 °C)
- Mischen und Fällung 2h bei -20 °C (oder -70 °C, 30 min)
- Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 12.000 g
- Waschen mit 50 µl 70 % EtOH, trocknen und in 100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufnehmen
- Einfrieren bis zur Verwendung bei -20 °C

#### 2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen (*Escherichia coli* XL-1 blue oder JM109)

- Animpfen von zweimal 0,5 l LB Medium mit 10 ml einer frischen ü. N. Kultur
- Inkubation im Schüttler bei 37 °C (3-5 h) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6
- Lagerung der Kultur 15-20 min auf Eis
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 l kaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendieren

## Material und Methoden

- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 0,5 l kaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor (GSA) bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen und Pellet in ca. 2 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH<sub>2</sub>O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca.  $1-3 \times 10^8$  Zellen/ml)
- Aliquotieren der Suspension in je 50 µl Einheiten und sofort bei -70 °C lagern

### 2.2.3.3 Bakterientransformation (Elektrotransformation)

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

- Auftauen kompetenter Zellen auf Eis
- Mischen der 50 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA Menge
- Überführen in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette
- Einsetzen der Küvette in Gene Pulser (BIORAD)
- Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellungen am Gene Pulser: Kapazität -25 µF, Spannung -1,8 KV, Widerstand -200 W)
- Küvette schnell entnehmen und 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugeben
- Inkubation im Schüttler bei 37 °C für 30 min
- Ausstreichen auf einem geeigneten Selektionsmedium und bei 37 °C ü.N. kultivieren

### 2.2.3.4 DNA Restriktionen

Die DNA Restriktionen erfolgten gemäß Herstellerangaben (Roche).

### 2.2.3.5 Gelelektrophorese

Trennung der DNA Fragmente erfolgte bei 100 - 150 V durch Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen (0,8 bis 1,2 % in TBE) mit Ethidiumbromid

## Material und Methoden

(Stammlösung: 10 mg/ml H<sub>2</sub>O davon 4 µl Ethidiumbromidlösung /100ml Agarosegel).  
Als relatives Maß für die Größe der DNA Fragmente diente eine 1 kb-Leiter (Bioline).

### **2.2.3.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel**

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

### **2.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA Lösungen**

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

### **2.2.3.8 Ligation von DNA Fragmenten**

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

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

### **2.2.3.9 Mini-Präparation von Plasmid DNA**

- Animpfen von 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum zur Selektion) mit Einzelkolonien
- Inkubation ü.N. bei 37 °C im Schüttler

## Material und Methoden

- Überführen von ca. 1,5 ml Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß, den Rest kühl lagern
- Zentrifugation in einer Tischzentrifuge 10 sek bei 13.000 rpm und den Überstand abnehmen
- Zugabe von 400 µl STET zum Pellet und durch Vortexen das Pellet lösen
- Kochen für 1 min, anschließend in einer Tischzentrifuge 8 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand zu 400 µl Isopropanol in ein neues Reaktionsgefäß schütten und 1 min invertieren
- Fällung in einer Tischzentrifuge für 8 min bei 13.000 rpm
- Pellet mit 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase-H<sub>2</sub>O resuspendieren

### 2.2.3.10 Midi-Präparation von Plasmid DNA

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

### 2.2.3.11 PCR

Für Standard Amplifikationen wurde entweder Plasmid DNA oder genomische DNA eingesetzt. Für die Amplifikation wurde folgender Reaktionsansatz (50 µl) angesetzt:

Template	1 ng	1 µl
10 x Puffer	1x	5 µl
dNTP	0,2 mM	1 µl
steriles ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	32 µl
Primer A (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Primer B (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
TaqDNA Polymerase (New England Biolabs)	1U	0,2 µl

## Material und Methoden

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

Standard-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C	3:00 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
Annealing (je nach Primerpaar)	60 °C (variabel)	0:15 min
Extension	72 °C	2:30 min (variabel)
Wiederholung der Schritte 2 - 4		35x
finale Extension	72 °C	8:00 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

### 2.2.3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Sequenzierungskit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham, Biosciences). Die Auswertung dieser Sequenzreaktionen wurden mit dem MegaBACE 500 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Zur Analyse der Sequenzdaten wurde das Programm *Lasergene DNA STAR* Software Package (GATC, Konstanz) verwendet.

### 2.2.3.13 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

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

### 2.2.3.14 Restriktion genomischer DNA für Southern-Blot Analysen

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

### 2.2.3.15 Southern-Transfer von DNA auf einen Nylonfilter

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

## Material und Methoden

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

### **2.2.3.16 Fluorescein-Markierung von DNA-Sonden**

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

### **2.2.3.17 Hybridisierung und Nachweisreaktion (Southern Blot)**

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

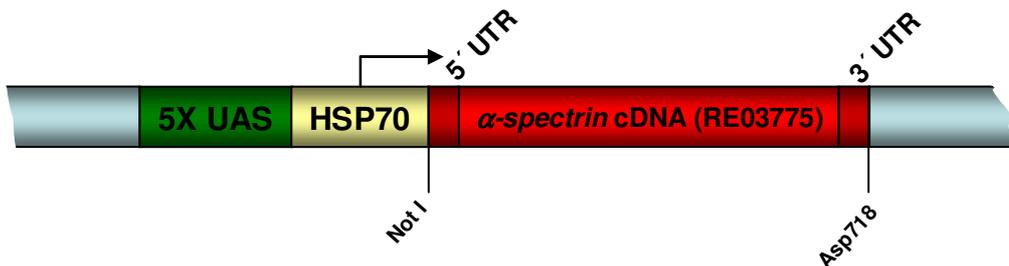
- Vorhybridisierung des Filters in Church-Hybridisierlösung für 30 min bei 65°C
- die markierte Probe für 1 min aufkochen und zum Filter geben
- Inkubation bei 65°C ü. N.
- Entfernung der Hybridisierlösung inkl. Sonde (Lagerung bei -20°C)
- 2 x 10 min bei 65°C mit Church-Waschlösung waschen
- 1 h in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

### 2.2.3.18 Sequenzierung von Mutanten

Um Basenaustausche im ORF von Genen zu untersuchen, wurden die zu untersuchenden Bereiche aus genomischer DNA heterozygoter Fliegen mittels Standard PCR Methoden amplifiziert, das PCR Produkt gereinigt und mit Sequenzierprimern direkt sequenziert. Im Gegensatz zu einer Standard PCR wurden allerdings ca. 200-300 ng Template DNA eingesetzt, um den Anteil der Fehler in der Amplifikation möglichst gering zu halten.

### 2.2.3.19 Klonierung des UAS $\alpha$ -spectrin Konstruktes

Der  $\alpha$ -Spectrin cDNA Klon RE03775 (BDGP) wurde mit Restriktionsanalysen auf Vollständigkeit überprüft. Mit den Restriktionsenzymen Asp718 und Not I wurde das ca. 8kb große Fragment, das den  $\alpha$ -spectrin ORF enthält; herausgeschnitten, gereinigt und in den mit Asp718 und Not I geöffneten pUAST Vektor (Brand and Perrimon, 1993) direktional kloniert (Abb. MM1).



**Abb. MM1: Schematische Übersicht des UAS  $\alpha$ -spectrin Konstruktes.**

### 2.2.3.20 Klonierung des MT-EGFP Konstruktes

Über eine PCR wurde insgesamt ein Fragment von 424bp aus dem Vektor pMT V5-His B (Invitrogen) amplifiziert, das den *metallothioneinA* Promotor (368bp) enthält. Durch eingefügte Schnittstellen für EcoRI und SpeI und entsprechende Verdauung konnte dieses Fragment in den pCaSpeR4 (Thummel and Pirrota, 1992) kloniert werden, so das CaSpeR4-MT erhalten wurde. Das den Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-ORF enthaltende Fragment wurde durch eine PCR aus dem Vektor EGFP-C1 (Clontech) gewonnen. Diese 1317bp lange Fragment enthält eine Kozak Konsensussequenz, den ORF EGFP und ein *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase Polyadenylierungssignal (alle Angaben Clontech). Der EGFP ORF enthält zusätzlich

## Material und Methoden

an seinem C-Terminus eine Multiple Cloning Site (MCS) mit Hilfe derer EGFP Proteinfusionen erstellt werden können.

In den 3' Primer wurde eine NheI Schnittstelle eingefügt und über eine weitere bereits vorhandene NheI Schnittstelle, konnte das EGFP PCR Fragment mit NheI verdaut werden, um kompatible Enden für den mit XbaI geöffneten CaSpeR4-MT Vektor zu erhalten. Über die NheI/XbaI Enden konnte das EGFP Fragment in den Vektor gebracht werden und über Testrestriktionen die richtige Orientierung des Fragmentes selektioniert werden (Abb. MM2). Durch die NheI/XbaI Klonierung gehen beide Schnittstellen verloren.

### MT Primer

MT EcoRI for        AGTGCCAGTGAATTcATTTCGTTGCAGGAC

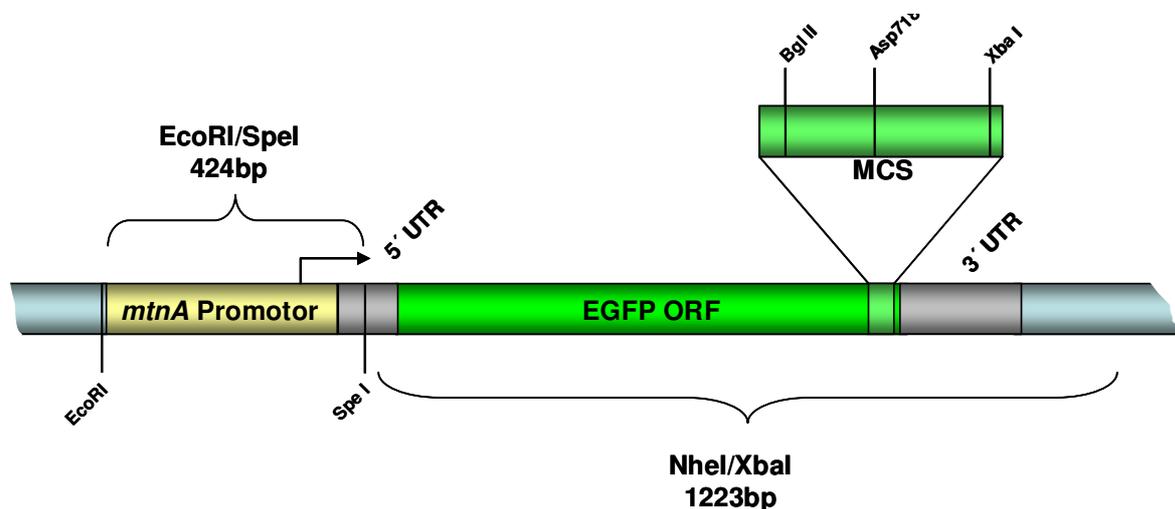
MT Spe I rev        TCCCCCacTAGTTGCACTGAGATGATTC

### EGFP Primer

EGFP for            CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGG

EGFP NheI rev      GCCCTGcTAGcCGGTTTTTCGCCCTTTG

Die eingefügten Schnittstellen sind unterstrichen.



**Abb. MM2: Schematische Übersicht des pCaSpeR MT-EGFP Konstrukts.**

## **2.2.4 Biochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Gewinnung von embryonalen Proteinextrakten**

Embryonen wurden mit PBT in MWP überführt, in 5 % NaOCl für 4 min dechorionisiert, dann gründlich mit Wasser gewaschen und in Reaktionsgefäße überführt. Durch Verwendung eines GFP-markierten Balancer-Chromosoms konnten dann unter dem UV-Binokular homozygot mutante Embryonen selektiert werden. Jeweils 30 dieser Embryonen wurden gesammelt und in 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer homogenisiert und 5 min aufgekocht. Von diesem Lysat wurden, nach Zentrifugation für 5 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm, 10 µl pro Gelspur in der nachfolgenden elektrophoretischen Auftrennung verwendet.

### **2.2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

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

Nach dem Auftrag der Proben erfolgte die Gelelektrophorese bei 30 mA für ca. 2 h. Die Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgt durch einen Vergleich mit standardisierten Markerproteinen. Die Proteine auf dem SDS Gel wurden anschließend über Western-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

### **2.2.4.3 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen**

Der Proteintransfer von SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Tank-Blot-Einheit der Firma Hoefer gemäß Herstellerangaben. Die PVDF-Membran wurde 10 sek. in Methanol aktiviert, 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 7 min in Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer geschah für 30 min bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA. Die Membran wurde 1 h in 10 % Milchpulver

## Material und Methoden

geblockt. Die verwendeten Antikörper wurden in geeigneter Konzentration in 10 % Milchpulver verdünnt und die Membran wurde in dieser Lösung bei 4 °C ü.N. auf dem Rolltaumler inkubiert. Die Membran wurde 5X 20 min in TBS Tween gewaschen und mit einem HRP sekundären Antikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wird dieser 5X 20 min in TBS Tween heruntergewaschen. Das ECL-Western- Blotting-Detektionssystem wurde der Firma Amersham wurde laut Herstellerangaben benutzt, um die Antigene nachzuweisen.

### 2.2.5 Zellkultur

Zellkulturexperimente wurden an *Drosophila* Schneider 2 Zellen (S2, Invitrogen) durchgeführt. Die S2 Zellen wurden in 10 ml Schneiders *Drosophila* Medium (GIBCO) mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS bei 25 °C kultiviert. Das Medium enthielt zudem 50 Einheiten Penicillin und 50 Einheiten Streptomycin-Sulfat pro ml. Bei einer Zelldichte von  $6 \times 10^6$  bis  $20 \times 10^6$  wurden die Zellen 1:5 verdünnt in eine neue Kulturflasche passagiert.

Zur Überprüfung des MT-EGFP Konstruktes erfolgte die Aussaat der Zellen in 24 Well Platten mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium. Die Zellen wurden ü.N. bei 25 °C kultiviert. Pro Well wurde ein Transfektionsansatz vorbereitet:

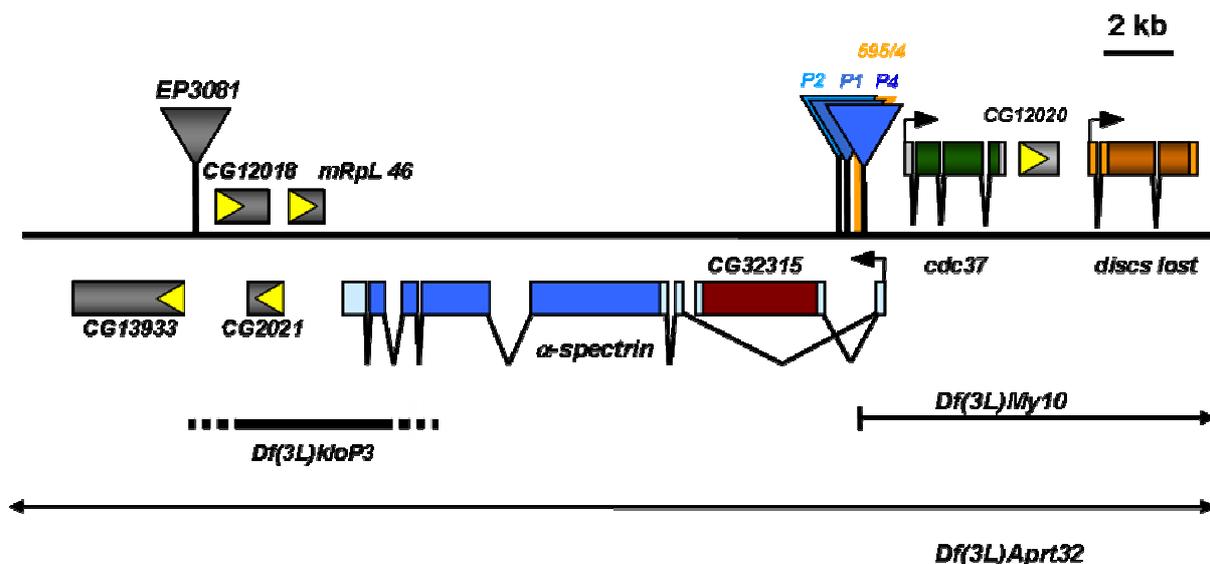
- 100 µl Schneiders Medium,
- 1 µl Fu Gene 6s
- 0,5 µg pCaSpeR MT-EGFP DNA
- 15 min bei RT stehen lassen.

Nach Abnahme des Kulturmediums wurden 100 µl des Transfektionsansatzes mit 400 µl Schneiders Medium pro Well zugegeben und ü.N. bei 25 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand durch Schneiders Medium ersetzt und die Zellen für einen Tag bei 25°C kultiviert. Durch Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  (Endkonzentration 500µM) wurde die Expression des EGFP Proteins induziert und die Fluoreszenz am nächsten Tag an einem Standard Fluoreszenz Mikroskop untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Was ist *klötzchen*?

Die Mutation *klötzchen* wurde in einem Screen auf embryonale ZNS Phänotypen isoliert (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b). Die EMS induzierten Allele *E2-26*, *E2-66*, *D4-65* und *N2-141* komplementieren einander nicht und zeigen einen fusionierte Kommissuren Phänotyp. Dieser Phänotyp schien dabei auf einen Defekt in der Zellpolarität der Mittellinienglia zurückzuführen sein (Pielage, 2002).



**Abb. 1: Die genomische  $\alpha$ -spectrin/CG32315 Region bei 62B 3-4.** Die Lage der Gene in der Region sind durch Kästen angedeutet. Die Dreiecke symbolisieren P-Element Insertionen. Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Die deletierten Regionen für die Defizienzen *Df(3L)My10* und *Df(3L)Aprt32* sind durch schwarze Pfeile markiert. Bei den CG Genen handelt es sich um vom Computer vorgenommene Annotationen (Computer Generated Genes, engl.). Details siehe Text.

Die *klötzchen* Mutation wurde auf die Region 62B des dritten Chromosoms kartiert (Abb. 1). Über einen „local hop“ Ansatz konnten P-Element induzierte Allele von *klötzchen* generiert werden. Die P-Element induzierten *klötzchen* Allele *P[kloP1]*, *P[kloP2]*, und *P[kloP4]* liegen alle im ersten Intron von  $\alpha$ -spectrin/CG32315. Sie wurden durch die Mobilisierung der EP Insertion *EP3081* erhalten, die ca. 4 kb distal von  $\alpha$ -spectrin liegt (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003; Rorth, 1996) Neben den Allelen *P[kloP1]*, *P[kloP2]*, und *P[kloP4]*, die sich genetisch ähnlich verhalten, konnte noch die Insertion *P[kloP3]* erhalten werden. Diese zeigt ebenfalls einen *klötzchen* artigen ZNS Phänotyp, komplementiert im Gegensatz zu den übrigen P-Elementen aber eine Mutation im Gen *discs lost*. Der Insertionsort des Allels *P[kloP3]* ließ sich

## Ergebnisse

über inverse PCR oder plasmid rescue nicht bestimmen. Weitere molekulare Analysen ließen aber vermuten, dass es sich um eine Excisionsmutante handelt, die Teile des  $\alpha$ -spectrin ORFs deletiert (siehe Abschnitt 3.1.1.3).

Die Lage der P-Elemente ließ vermuten, dass *klötzchen* allelisch zu  $\alpha$ -spectrin ist. Tatsächlich komplementieren die *klötzchen* Allele ein Nullallel von  $\alpha$ -spectrin nicht. Außerdem lassen sich Kombinationen verschiedener *klötzchen* Allele in trans über ein synthetisches  $\alpha$ -spectrin Minigen zur Vitalität retten (Pielage, 2002). Allerdings zeigt das  $\alpha$ -spectrin Nullallel *rg41* (Lee et al., 1993) keine fusionierten Kommissuren, sondern ist weitgehend wildtypisch.

Dieser Widerspruch in den Daten wurde mit der komplexen Organisation des  $\alpha$ -spectrin Locus zu erklären versucht (Pielage, 2002). So liegt im ersten Intron von  $\alpha$ -spectrin ein weiteres Gen, das sich den Promotor und das erste nicht translatierte Exon mit  $\alpha$ -spectrin teilt. Dieses Gen *CG32315* kodiert für ein Protein von 1240 Aminosäuren Länge, dessen Sequenz keine Homologie zu bekannten Proteindomänen oder zum  $\alpha$ -Spectrin Protein aufweist.

Aufgrund der Insertionsorte der *klötzchen* P-Elemente und der verschachtelten genomischen Organisation ist anzunehmen, dass neben  $\alpha$ -spectrin auch die Transkriptionseinheit *CG32315* durch die P-Insertionen zerstört wird. Bei diesen P-Insertionen handelt es sich also höchstwahrscheinlich um Doppelmутanten, die sowohl  $\alpha$ -spectrin als auch *CG32315* betreffen. Damit wäre es ebenso möglich, dass *CG32315* für *klötzchen* kodiert. Es wurde postuliert, dass es sich bei diesem Gen um einen Regulator der  $\alpha$ -spectrin mRNA Stabilität handelt (Pielage, 2002). Fehlte dieser, käme es zu einer vorzeitigen Degradation der maternalen  $\alpha$ -spectrin mRNA und damit zu einem früheren Absinken der  $\alpha$ -Spectrin Proteinlevel im Vergleich zu der zygotischen  $\alpha$ -spectrin Nullmutante (Pielage, 2002). Da  $\alpha$ -spectrin in der Oogenese benötigt wird, konnte die maternale Komponente über die Generierung von Keimbahnklonen nicht direkt ausgeschaltet werden (Chou et al., 1993; Chou and Perrimon, 1996; Chou and Perrimon, 1992; de Cuevas et al., 1996).

Tatsächlich wurden Aminosäureaustausche im *CG32315* ORF in den *klötzchen* Mutanten gefunden (Pielage, 2002). Ob diese allerdings die Funktion des Proteins beeinflussen, war unklar. Wenn *klötzchen* wirklich *CG32315* betrifft, muss erklärt werden, warum  $\alpha$ -spectrin Mutanten *CG32315/klo* Mutanten nicht komplementieren, obwohl es sich um unterschiedliche Genprodukte handelt. Zum einen wäre es

## Ergebnisse

denkbar, dass es sich um eine so genannte synthetische Letalität handelt, in der sich unterschiedliche Gene nicht komplementieren, weil sie funktionell sehr eng zusammenhängen (Gertler et al., 1989; Giniger, 1998; Lucchesi, 1968; Vassin et al., 1985).

Zum anderen gibt es die Möglichkeit, dass es sich bei den EMS induzierten *klötzchen* Allelen um *CG32315/α-spectrin* Doppelmutanten handelt, in denen z.B. die gemeinsame Promotorregion mutiert ist oder aber die Regulation des alternativen Spleißens der gemeinsamen prä-mRNA gestört ist.

Die genetische Komplexität des Locus wird durch den Umstand weiter verschärft, dass beschrieben wurde, dass die P-Insertion *P[discs lost<sup>595/4</sup>]* cis-regulatorische Sequenzen für das ca. 4kb proximal von *α-spectrin* liegende Gen *discs lost* zerstört (Bhat et al., 1999). Tatsächlich komplementieren alle P-Elemente, die im ersten Intron von *α-spectrin* liegen das *discs lost* EMS Allel *dre-1* nicht. Es handelt sich bei diesen Insertionen möglicherweise um Dreifachmutanten (Abb. 3). *discs lost* kodiert für ein multi-PDZ Protein, welches für die Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität essentiell ist (Bhat et al., 1999; Nam and Choi, 2003). Es ist homolog zu dem Patj Protein (Pals associated-tight-junction-protein, engl.) der Vertebraten (Lemmers et al., 2002). Neben weiteren vorhergesagten Genen für die bisher keine Mutationen isoliert wurden, liegt in der Region noch das essentielle Gen *cdc37*. Es kodiert für ein Chaperon und wurde im Zusammenhang mit dem *sevenless* Signaltransduktionsweg isoliert (Cutforth and Rubin, 1994). Die *cdc37<sup>E(sev)3B</sup>* Mutante wird allerdings von allen *klötzchen* Allelen komplementiert, so dass *cdc37* sicher nicht für *klötzchen* kodiert. Die wichtigsten genetischen Zusammenhänge der *α-spectrin/klötzchen* Region sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

	<i>P]kloP1/2/4]</i> <i>/P[discs lost<sup>595/4</sup>]</i>	<i>Df(3L)My10</i>	<i>P[kloP3]</i>	<i>discs lost<sup>ems</sup></i>	Phäno- typ
<i>α-spectrin</i> <sup>EMS</sup>	-	-	-	+	wt
<i>klötzchen</i> <sup>EMS</sup>	-	-	-	+	<i>klo</i>
<i>discs lost</i> <sup>EMS</sup>	-	-	+	-	wt
Phänotyp	<i>klo</i>	<i>klo</i>	<i>klo</i>	wt	

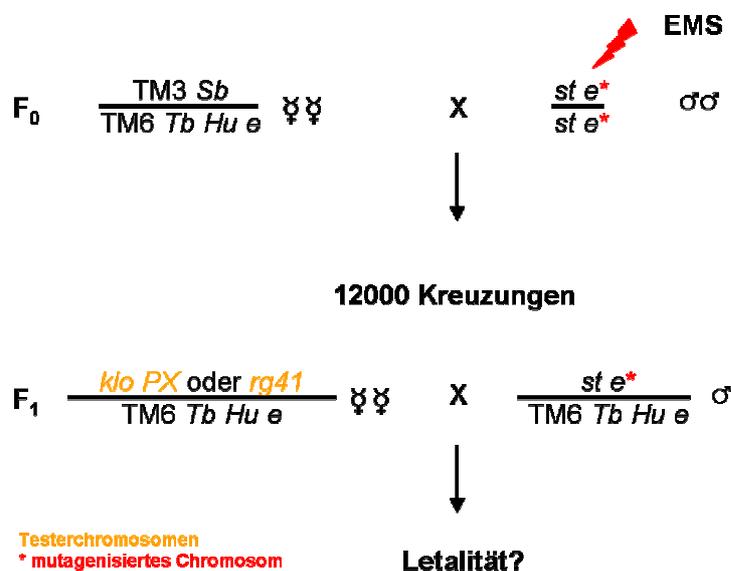
**Tab. 1: Genetische Zusammenhänge der *α-spectrin/klötzchen* Region.** Daten nach Pielage, 2002. Schematische Darstellung des Komplementationsverhaltens der verschiedenen *klötzchen*, *α-spectrin* und *discs lost* Allele. -: keine Komplementation; +: Komplementation; *klo*: embryonaler *klötzchen* ZNS Phänotyp; wt: wildtypisches ZNS.

## Ergebnisse

### 3.1.1 Genetische Analyse der $\alpha$ -spectrin/CG32315 Region

#### 3.1.1.1 EMS Mutagenese

Um die Unklarheiten in dieser komplexen genetischen Situation zu klären, wurde eine EMS Mutagenese durchgeführt, um neue Allele für *klötzchen* und  $\alpha$ -spectrin zu generieren. Wenn es sich bei *klötzchen* tatsächlich um einen essentiellen  $\alpha$ -spectrin Regulator handelt, sollten die beiden Loci genetisch trennbar sein. Um die Frage zu klären, ob *CG32315* tatsächlich für *klötzchen* kodiert, sollte nach Stoppmutationen in den neu generierten *klo*-Allelen gesucht werden.



**Abb. 2: Kreuzungsschema der EMS Mutagenese.** Details Siehe Text.

Dazu wurde eine F2 Mutagenese, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, durchgeführt. Als Testerchromosomen wurden zum einen die verschiedenen P-Element induzierten *klötzchen* Allele  $P[kloP1]$ - $P[kloP4]$  und eine Rekombinante der  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> Mutante mit der Excisionsmutante  $\Delta 381$  (Lammel, unveröffentlicht) eingesetzt. Die  $\Delta 381$  Exzision wurde von der  $P[lacW]$  Insertion *AA142* bei 66D15 aus generiert und deletiert die Transkriptionseinheit *CG32030*. Hierbei handelt es sich um ein Formin-artiges Protein, das unter anderem in Mittellinienglia exprimiert wird. Für dieses Gen, welches keinen weiteren Bezug zu der *klötzchen* Fragestellung hat, sollten innerhalb der Mutagenese ebenfalls Allele isoliert werden, die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter behandelt werden (Lammel, unveröffentlicht).

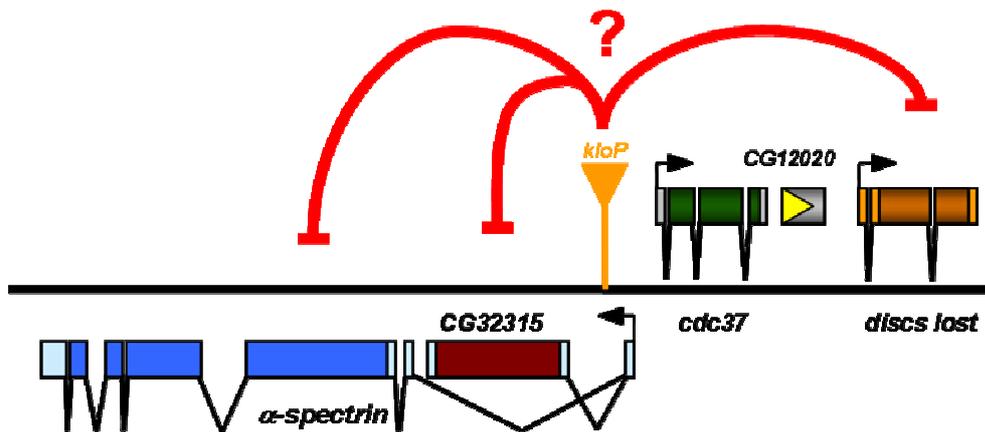
Es wurden ca. 12000 Chromosomen auf Letalität in trans zu den Testerchromosomen untersucht. Dabei wurden ca. 6000 Chromosomen in trans zu

## Ergebnisse

den *klötzchen*-Allelen *P[kloP1]*, *P[kloP2]*, *P[kloP3]* und *P[kloP4]* und noch mal ca. 6000 in trans zu der  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup>  $\Delta$ 381 Rekombinante getestet.

Über den Marker *ebony* konnten die mutagenisierten Chromosomen von den Testerchromosomen unterschieden und entsprechende Stämme etabliert werden.

### 3.1.1.2 Screen über die *klötzchen* P-Elemente und $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup>



**Abb. 3: Möglicher Effekt der *klötzchen* P-Elemente.** Aufgrund des Insertionsortes der P-Elemente ist davon auszugehen, dass neben  $\alpha$ -spectrin auch CG32315 zerstört wird. Weiter wurde ein cis-regulatorischer Effekt auf das proximale *discs lost* beschrieben (Bhat et al., 1999). Details siehe Text.

Im Letalitätsscreen über die *klötzchen* P-Elemente konnten aus ca. 6000 isolierten Chromosomen 18 mutante Chromosomen isoliert werden. Diese wurden dann nochmals einzeln gegen verschiedene Defizienzen, *klötzchen*,  $\alpha$ -spectrin, *cdc37* und *discs lost* Mutationen komplementiert.

Dabei zeigte sich, dass die Mutanten in drei Komplementationsgruppen eingeteilt werden konnten: *discs lost*,  $\alpha$ -spectrin und die unerwartete Gruppe *no name yet* (*nny*). Die Mitglieder der *no name yet* Gruppe zeichnen sich dadurch aus, dass sie zwar mindestens ein *klötzchen* P-Element Allel nicht komplementieren, aber keine Letalität in trans zu der Defizienz *Df(3L)My10* zeigen. Ihr fehlen Teile des ersten Introns, das erste Exon und die komplette Promotorsequenz von  $\alpha$ -spectrin und CG32315 und sie verhält sich wie ein  $\alpha$ -spectrin Nullallel (siehe Abschnitt 3.1.4.2). Es ist damit anzunehmen, dass sich diese Defizienz auch für CG32315 als Nullallel verhält.

Mutante	DF(3L) MY10	DF(3L) Aprt32	P[kloP1]	P[kloP2]	P[kloP3]	P[kloP4]	klo <sup>E2-28</sup>	klo <sup>P4-68</sup>	klo <sup>N2-141</sup>	α- spec <sup>1941</sup>	dithe1	cdc37E <sup>(see)3B</sup>
A-1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
C-1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
N-1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
O-2	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
E-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
J-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
N-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
P-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
S-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
U-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
P-1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S-2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
U-2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
V-1	+	-	-	+	+	Esc	+	+	+	+	+	+
V-4	+	-	-	-	-	Esc	+	+	+	+	+	+

Tab. 2: Komplementation I. Mutanten die über die Testerschromosomen P[kloPx] erhalten wurden. +: Komplementation, -: keine Komplementation, Esc: wenige mutante Escaper Fliegen geschlüpft (<10%)

Mutante	Df(3L) MY10	Df(3L) Aprt32	P[kloP1]	P[kloP2]	P[kloP3]	P[kloP4]	klo <sup>E2-26</sup>	klo <sup>D4-65</sup>	klo <sup>N2-141</sup>	$\alpha$ - spec <sup>rg41</sup>	dit <sup>dre1</sup>	cdc37E <sup>(sev)3B</sup>
HR-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
KR-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1.2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	Esc.	-	+	+
1.2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	Esc.	-	+	+
1.4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1.4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2.4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2.4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2.6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2.6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2.7.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

**Tab. 3: Komplementation II. Mutanten die über die Testerschromosomen  $\alpha$ -spec<sup>trig41</sup> erhalten wurden. +: Komplementation, -: keine Komplementation, Esc: wenige mutante Escaper Fliegen geschlüpft (<10%)**

$\sigma$ / $\varnothing$	A-1	C-1	E-1	F-1	F-2	J-1	N-1	N-2	O-1	O-2	P-1	P-2	S-1	S-2	U-1	U-2	V-1	V-4	$\sigma$ / $\varnothing$
A-1		- pu	+	+	+	+	- pu	+	+	- pu	+	+	+	+	- pu	+	+	+	A-1
C-1			+	+	+	+	- pu	+	+	- pu	+	+	+	+	- pu	+	+	+	C-1
E-1				-	-	-	+	-	+	+	+	Esc	-	+	-	+	+	+	E-1
F-1					-	-	+	-	+	+	+	Esc	-	+	-	+	+	+	F-1
F-2						-	+	-	+	+	+	- pu	-	+	-	+	+	+	F-2
J-1							+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	J-1
N-1								+	+	- pu	+	+	+	+	- pu	+	+	+	N-1
N-2									+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	N-2
O-1										+	+	+	+	- pu	+	- pu	+	- pu	O-1
O-2											+	+	+	+	- pu	+	+	+	O-2
P-1												+	+	+	+	+	+	+	P-1
P-2													Esc	+	-	+	+	+	P-2
S-1														+	-	+	+	+	S-1
S-2															+	- pu	+	- pu	S-2
U-1																+	+	n.d.	U-1
U-2																	+	- pu	U-2
V-1																		+	V-1
V-4																			V-4

Tab. 4: Komplementation III. Mutanten die über die Testerschromosomen P(kioPX) erhalten wurden in der Komplementation untereinander. +: Komplementation, -: keine Komplementation, Esc: wenige mutante Escaper Fliegen geschlüpft (<10%); pu: pupal letal; n.d.: keine Daten.

## Ergebnisse

Die Komplementationsgruppe *no name yet* zeigt pupale Letalität und betrifft nicht *CG32315*. Da unklar ist, welches Gen betroffen ist, wurde die Komplementationsgruppe vorerst *no name yet (nny)* benannt. Zu ihr gehören formal die Allele *O-1*, *P-1*, *S-2*, *U-2*, *V-1* und *V-4*.

Die Allele *A-1*, *C-1*, *N-1* und *O-2* gehören zur Komplementationsgruppe *discs lost*. Sie zeigen in trans zur Defizienz *Aprt32*, welche die gesamte Region deletiert, und untereinander pupale Letalität (Tabellen 2, 4 und 5).

	<i>discs lost<sup>dre-1</sup></i>	<i>discs lost<sup>A-1</sup></i>	<i>discs lost<sup>C-1</sup></i>	<i>discs lost<sup>N-1</sup></i>	<i>discs lost<sup>O-2</sup></i>
homozygot	0%	28%	32%	0%	16%
<i>Df(3L)Aprt32</i>	25%	24%	32%	29%	31%

**Tab. 5: Pupale Vitalität der *discs lost* Allele.** Der Anteil an *discs lost* mutanten Puppen wurde in Homozygose und in trans zur Defizienz *Df(3L)Aprt32* bestimmt. Liegt der Wert unter 33%, zeigt dies eine partielle larvale Letalität an. Es wurden jeweils mindestens 150 Puppen ausgezählt.

Eine weitere Komplementationsgruppe bilden formal *α-spectrin/klötzchen*. Die Allele *E-1*, *F-1*, *F-2*, *J-1*, *N-2*, *P-2*, *S-1* und *U-1* komplementieren *α-spectrin<sup>rg41</sup>* und *klötzchen* Allele nicht. In trans zu *Df(3L)Aprt32* zeigen die Allele larvale Letalität. Das Allel *U-1* komplementiert weder *α-spectrin*, *discs lost* noch *cdc37* und ist damit wahrscheinlich eine EMS induzierte Defizienz (Ashburner, 1989)

In dem zweiten Mutagenese Ansatz wurde *α-spectrin<sup>rg41</sup>* als Testerchromosom verwendet. Dabei wurden aus ca. 6000 Kreuzungen 14 Chromosomen isoliert, bei denen es sich um *α-spectrin/klötzchen* Allele handelt. Keines der über das *α-spectrin<sup>rg41</sup>* Chromosom isolierten Allele zeigt Letalität in trans zu *cdc37* oder *discs lost*.

### 3.1.1.3 Komplementationsgruppe *nny*

Zur weiteren Analyse wurden die verschiedenen putativen *nny* Allele untereinander einem Komplementationstest unterzogen (Tab. 4 und 6). Dabei konnten nur die Allele *O-1*, *S-2*, *U-2* und *V-4* eindeutig der *nny* Komplementationsgruppe zugeordnet werden. Die Allele *P-1* und *V-1* komplementierten die anderen *nny*-Allele, und auch *P-1* ist in trans zu *V-1* vital (Tab. 7). Diese Allele könnten also jeweils eigene Komplementationsgruppen bilden und über Hintergrundmutationen in den *klötzchen*

## Ergebnisse

P-Elementen isoliert worden sein. Es wäre auch möglich, dass es bei diesen Allelen zu intragener Komplementation kommt, z.B. weil es sich um besonders schwache Allele des *nny* Gens handelt. Dass es sich um ein schwaches Allel handelt, scheint für das EMS Allel *P-1* unwahrscheinlich, da es gegen alle *klötzchen* P-Elemente letal ist, wohingegen *V-4* ein eindeutiges *nny*-Allel, Escaper in trans zu *P[kloP4]* generiert (Tab. 6 und 7).

Mutante	<i>nny</i> <sup>O-1</sup>	<i>P[kloP2]</i>	<i>P[kloP3]</i>	<i>P[kloP4]</i>	<i>P[discs lost</i> <sup>595/4</sup> <i>]</i>	<i>Df(3L)My10</i>
<i>nny</i> <sup>S-2</sup>	-	-	-	-	+	+
<i>nny</i> <sup>U-2</sup>	-	-	-	-	+	+
<i>nny</i> <sup>V-4</sup>	-	-	-	Esc	+	+
<i>nny</i> <sup>O-1</sup>		-	-	-	+	+

**Tab. 6: Komplementationsanalyse von *no name yet* Allelen.** *P[discs lost*<sup>595/4</sup>*]* und die Defizienz *My10* komplementieren, im Gegensatz zu den *P[klo-Px]* Insertionen, *nny* EMS Allele. Dies deutet darauf hin, dass *nny* distal von *α-spectrin/CG32315* kartiert. Esc: einige Escaper-Tiere schlüpfen. Vergleiche auch Tabelle 2 und 4.

Mutante	<i>P-1</i>	<i>nny</i> <sup>EMS</sup>	<i>P[kloP1]</i>	<i>P[kloP3]</i>
<i>P-1</i>		+	-	-
<i>V-1</i>	+	+	-	+

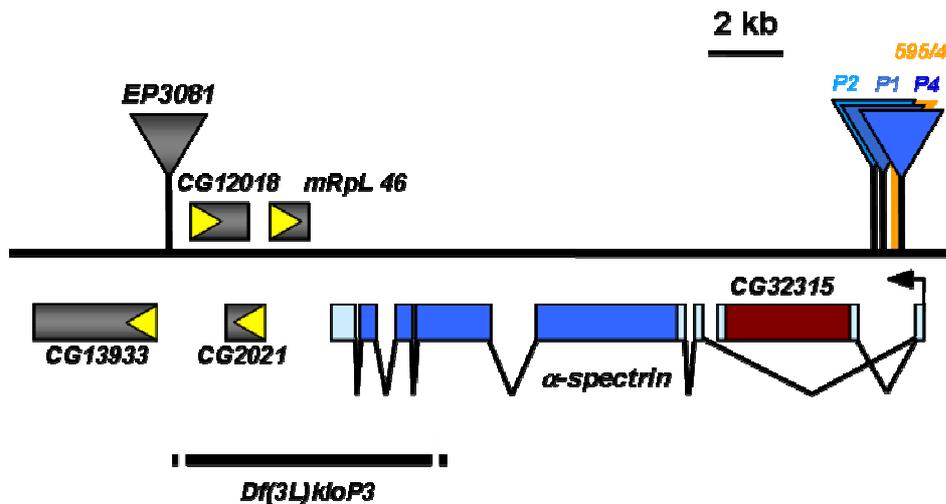
**Tab. 7: Komplementationsanalyse der Allele *P-1* und *V-1*.** *P-1* und *V-1* komplementieren einander und *nny* EMS induzierte Allele (*nny*<sup>S-2</sup>, *nny*<sup>U-2</sup>, *nny*<sup>O-1</sup>, *nny*<sup>V-4</sup>), sind aber letal über *P[kloP1]*. Vergleiche auch Tabelle 2 und 4.

Die Letalität der *nny* Gruppe ist nicht mit *CG32315* assoziiert. Sowohl die Defizienz *Df(3L)My10* als auch die P-Insertion *P[discs lost*<sup>595/4</sup>*]* komplementieren die *nny* Allele (Tab. 6). Obwohl die *P[discs lost*<sup>595/4</sup>*]* Insertion direkt benachbart zu den *klötzchen* P-Elementen liegt und sich auch sonst genetisch und phänotypisch gleich verhält (Daten nicht gezeigt) komplementiert sie *nny*. Dies lässt darauf schließen, dass es bei der Mobilisierung des P-Elements *P[EP3081]* (siehe Abb. 1) eventuell zu einer lokalen Defizienzenbildung gekommen ist ((Ashburner, 1989)). Der Ausgangsstamm *P[EP3081]* ist vital und lässt sich so zur Komplementation gegen die *nny* Allele nicht einsetzen.

Um die Lage von *nny* besser zu charakterisieren, wurde die Ausdehnung der *P[kloP3]* assoziierten Defizienz genauer bestimmt, da *P[kloP3]* die *nny*-Allele nicht

## Ergebnisse

komplementiert. Eine PCR Analyse zeigte, dass der linke Bereich der ursprünglichen *P[EP3081]* Insertion in *P[kloP3]* Tieren intakt ist, sich aber das rechte Ende des P-Elements nicht mehr nachweisen ließ (persönliche Mitteilung J. Pielage): Damit liegt der linke Bruchpunkt der *P[kloP3]* assoziierten Defizienz im P-Element. Über Southern Blots konnte der rechte Bruchpunkt in das 4. Exon von  $\alpha$ -spectrin kartiert werden und damit erstreckt sich die Defizienz *Df(3L)kloP3* von dort bis zu *P[EP3081]* und deletiert ca. 5 kb genomische Sequenz (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Lage der *P[kloP3]* assoziierten Defizienz.** Der rechte Bruchpunkt der Defizienz *Df(3L)kloP3* liegt im 4. Exon von  $\alpha$ -spectrin und der rechte Bruchpunkt liegt in *P[EP3081]*. Damit deletiert *Df(3L)kloP3* die drei Gene *CG12018*, *CG2021* und *mRpL46*. Eventuell ist auch *CG13933* betroffen, da hier Promotorsequenzen zerstört sein könnten.

Daraus ergeben sich vier Gene, die am wahrscheinlichsten *nny* kodieren könnten (Abb. 4). Bei allen handelt es sich um wenig beschriebene Gene, für die keine Mutanten existieren und deren mögliche Funktion nur aus den Sequenzdaten abgeleitet wurde.

Bei *CG13933* handelt es sich um ein 671 Aminosäuren großes Protein, das 3 Ankyrin Wiederholungen und eine C-terminale SOCS Domäne enthält (Flybase).

*CG2021* kodiert für ein 95 Aminosäuren kleines Protein, das ein Teil des kleinen nukleären Ribonukleoprotein Komplexes U6 darstellt (small\_nuclear\_RiboNucleo\_Proteincomplexe, snRNP U6). Dieses snRNP ist an der Prozessierung der prä-mRNA beteiligt (Mount and Salz, 2000). Bei *CG12018* handelt es sich um eine Untereinheit des DNA-Polymerase Delta Komplexes und ist 431 Aminosäuren lang. *mRp L46* kodiert für das 258 Aminosäuren große mitochondriale Ribosomale Protein

## Ergebnisse

L46 (engl.), welches eine Untereinheit der großen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms bildet (Koc et al., 2001).

### 3.1.1.4 CG32315 kodiert für Discs lost

Das *discs lost*<sup>dre-1</sup> Allel wurde auf die Transkriptionseinheit CG12021 kartiert (Bhat et al., 1999). Es handelt sich um ein Protein mit vier PDZ Domänen, welches eine starke Homologie zu humanem Patj (Pals-associated-tight-junction-protein) aufweist (Bhat et al., 1999; Lemmers et al., 2002). Es wurde publiziert, dass der Verlust von *discs lost* zu embryonaler Letalität führt und schwere Defekte in der epithelialen Zellpolarität auftreten (Bhat et al., 1999). Bei dieser Nullmutante handelt es sich um die Defizienz *Df(3L)My10* (siehe Abb. 1 und Tab. 2), die eine Reihe von Genen deletiert. Dazu gehören z.B. Patj *CG12021*, *CG12020* und *jtbr* (nicht dargestellt). Im Gegensatz zu den von Bhat et al. 1999 publizierten Daten komplementiert *Df(3L)My10* auch  $\alpha$ -*spectrin* Mutanten nicht (Tab. 1 und 2, (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003)). Da in dieser Defizienz die gesamte Promotorregion und das erste Exon deletiert ist, und sich *CG32315* sich diese mit  $\alpha$ -*spectrin* teilt, ist davon auszugehen, dass *Df(3L)My10* auch *CG32315* deletiert. Darüber hinaus zeigen alle im ersten Intron von  $\alpha$ -*spectrin/CG32315* inserierten P-Elemente (*P[kloP1/2/4]* und *P[discs lost*<sup>595/4</sup>]) Letalität über  $\alpha$ -*spectrin* und *CG32315*. Für die *discs lost* Allele *discs lost*<sup>dre-1</sup> und *discs lost*<sup>N-1</sup> wurde eine Sequenzanalyse von ca. 3kb genomischer Sequenz durchgeführt, die den Patj ORF vollständig enthält. Dabei konnten aber keine Aminosäureaustausche oder Stopps aufgedeckt werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass es sich bei den *discs lost* Allelen nicht um Mutationen in *patj*, sondern in *CG32315* handelt. Diese Annahme würde die genetische Situation in dieser Region am einfachsten erklären. Die P-Elemente zerstören die beiden Transkriptionseinheiten in dessen Intron sie inseriert sind. Eine Zerstörung cis-regulatorischer Sequenzen, die zwar denkbar aber unwahrscheinlich ist, muss so nicht postuliert werden.

Um diese Hypothese zu testen, wurde ein *CG32315* Minigen (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003), das *CG32315* ubiquitär exprimiert, in den Hintergrund verschiedener *discs lost* mutanter Kombinationen gebracht (Tab. 8). Tatsächlich konnte das *CG32315* Minigen in einer Kopie die *discs lost* induzierte Letalität zu voller Vitalität retten. Es ließen sich diverse *discs lost* mutante Kombinationen, z.B. auch die *discs lost* Mutante *A-1* in Homozygose, zu phänotypisch wildtypischen, fertilen Fliegen

## Ergebnisse

retten (Tab.:8). Dies zeigt eindeutig, dass *Discs lost* durch *CG32315* kodiert wird. Daraufhin wurde *CG32315* in *discs lost* umbenannt, da es eindeutig für den namensgebenden Phänotyp, den weitgehenden Verlust der Imaginalscheiben, verantwortlich ist. Die bisher *discs lost* benannte Transkriptionseinheit *CG12021*, die für das *Drosophila* Homolog des Vertebraten *patj* kodiert, wurde in *patj* umbenannt. Die früh larvale Letalität des *dre-1* Stammes in Homozygose lässt vermuten, dass das mutante Chromosom einen weiteren, letalen Treffer aufweist. Tatsächlich lässt sich der *dre-1* Stamm durch *CG32315* nicht zu Vitalität retten.

	<i>Df(3L)</i> <i>My10</i>	<i>Df(3L)</i> <i>Aprt32</i>	<i>A-1</i>	<i>C-1</i>	<i>N-1</i>	<i>dre-1</i>
<i>ubi-CG32315; dre-1</i>	+	+	+	+	+	-
<i>ubi-CG32315; A-1</i>	+	+	+	+	+	+

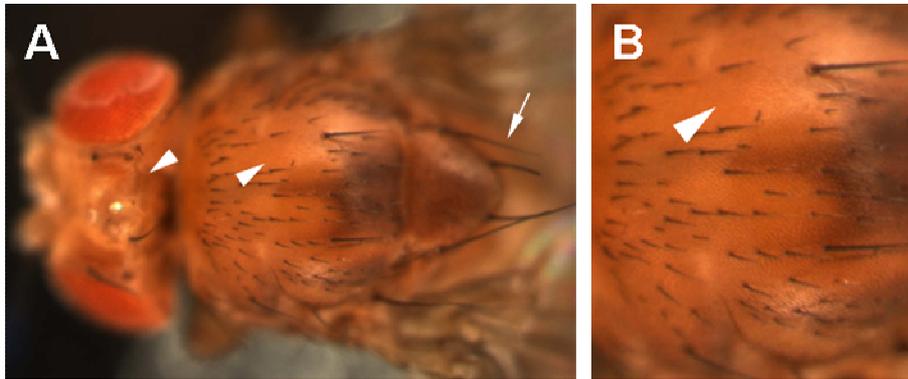
**Tab. 8: Rettung der *discs lost* Letalität.** Verschiedene *discs lost* mutante Kombinationen können durch das *ubi-CG32315* Konstrukt zur Vitalität gerettet werden. + bedeutet eine vollständige Rettung, - bedeutet keine Rettung zu beobachten.

Um die Funktionalität eines UAS *CG32315* (*UAS-discs lost*) Konstruktes (Pielage, 2002) zu testen, wurde in den Hintergrund von *Df(3L)My10/discs lost<sup>dre-1</sup>* zum einen das UAS Konstrukt und zum anderen der weitgehend ubiquitäre Treiber *armadillo-Gal4* gebracht. Dies führt zu einer Rettung der pupalen *discs lost* Letalität zur Lebensfähigkeit. Allerdings ist die Rettung nicht vollständig. Zum einen schlüpfen im Vergleich zur *ubi-CG32315* Rettung weniger Tiere und diese zeigen vor allem auf dem Thorax eine reduzierte Anzahl an Borsten (nicht gezeigt, vgl. Abb. 5). Es wurde in gleicher Weise versucht *discs lost* mittels eines UAS *CG32315* Konstruktes zu retten, welches mit einem 8X MYC-Tag versehen ist (Stork, 2002). Das Anhängen der MYC Epitope führte aufgrund der Klonierungsstrategie zur Deletion von ca. 50 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins. Dies scheint die Funktion jedoch nicht wesentlich zu beeinträchtigen, da auch dieses Konstrukt getrieben mit *armadillo-Gal4* fähig ist, die Letalität von *Df(3L)My10/discs lost<sup>dre-1</sup>* zu retten. Es werden im Vergleich zu UAS *CG32315* etwas weniger gerettete Tiere gefunden. Diese zeigen eine ähnliche Reduktion der Borsten auf dem Thorax (Abb. 5).

Die, im Vergleich zu der *ubi-CG32315* Rettung, unvollständige Rettung der UAS Konstrukte scheint nicht mit der Funktionalität der exprimierten Proteine selbst zusammen zuhängen, sondern mit der unzureichenden Expression des *armadillo-*

## Ergebnisse

Gal4 Treibers. Die Konstrukte *ubi-CG32315* und *UAS CG32315* enthalten beide das gleiche cDNA Fragment und exprimieren beide das vollständige Protein, trotzdem ist die Gal4/UAS Rettung schwächer. Die ubiquitäre Überexpression von *UAS CG32315* bzw. *UAS CG32315 8XMYC* führte im wildtypischen Hintergrund nie zu einem Verlust von Borsten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 5: CG32315 8XMYC ist ein funktionsfähiges Protein.** Rettung der Letalität *Df(3L)My10/discs lost<sup>dre-1</sup>* durch die Expression von *CG32315 8XMYC* (*arm-Gal4/UAS CG32315 8XMYC; Df(3L)My10/discs lost<sup>dre-1</sup>*). (A) Kopf und Thorax einer geretteten Fliege, (B) Detailansicht des Thorax. Die Rettung ist nicht vollständig, es kommt zu einem Verlust von Borsten am Kopf und auf dem Thorax (Peilspitzen in A und B). Die Borsten, die gebildet werden, sind kürzer und dünner als im Wildtyp. Besonders die Mikrochaeten des Thorax sind betroffen. Die Makrochaeten des Scutellums sind in der Regel vorhanden aber auch leicht verkürzt (Pfeil in A).

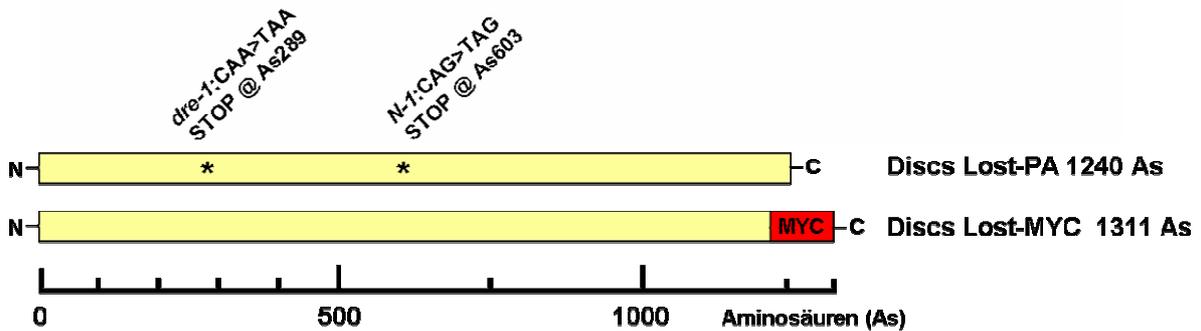
### 3.1.1.5 Die *discs lost* Mutanten *dre-1* und *N-1* tragen vorzeitige Stopp Codons im *CG32315* ORF

Um weiter zu zeigen, dass es sich bei *CG32315* um *discs lost* handelt, wurde der ORF dieses Transkriptes sequenziert. Dazu wurde genomische DNA aus heterozygoten *discs lost<sup>N-1</sup>* bzw. *discs lost<sup>dre-1</sup>* Fliegen gewonnen, daraus der *CG32315* ORF in zwei PCR Fragmenten amplifiziert und diese dann sequenziert. Anhand der Elektropherogramme konnten dann heterozygote Bereiche identifiziert und auf eine mögliche Veränderung der Aminosäuresequenz überprüft werden.

Dabei konnten in *N-1* und *dre-1* frühzeitige Stopp Codone identifiziert werden. Im *N-1* Chromosom führt eine Mutation eines Cytosins in ein Thymin (CAG>TAG) bei Aminosäure 603 (Glutamin) zu einem Stoppcodon (Abb. 6). Das daraus resultierende Protein ist etwa halb so lang wie das wildtypische.

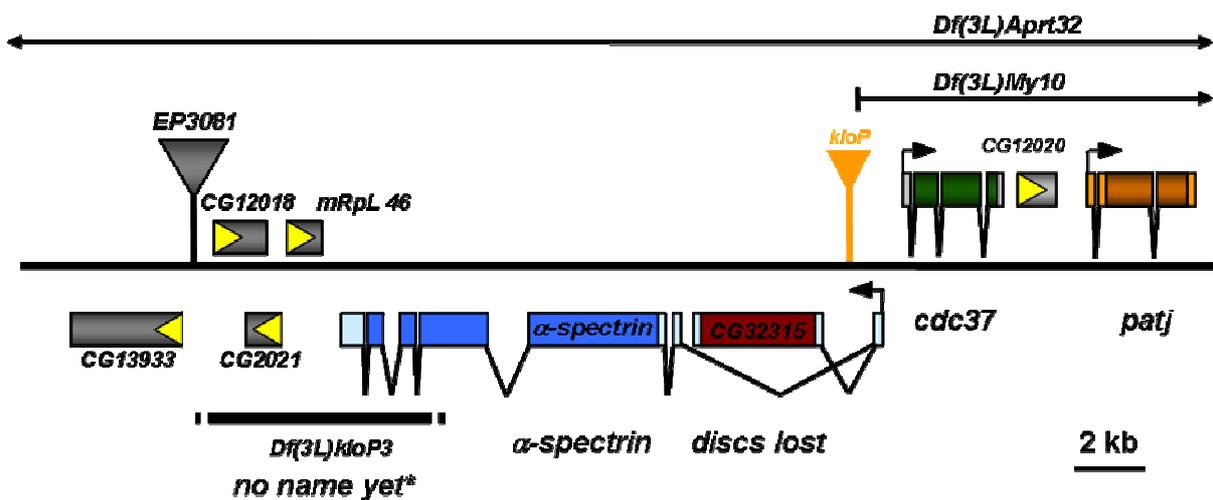
Im *dre-1* Chromosom kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch bei Aminosäure 289. Hier ist das Codon für Glutamin durch einen Austausch von einem Cytosin in ein Thymin in ein Stoppcodon mutiert (CAA>TAA) (Abb. 6). Diese Daten bestätigen weiter den Befund, dass es sich bei *CG32315* um *discs lost* handelt.

## Ergebnisse



**Abb. 6: Schematische Ansicht des Discs lost/CG32315 Proteins.** Das Discs lost Protein ist 1240 Aminosäuren (As) lang und weist keine Homologie zu bekannten Domänen auf. Die Lage der vorzeitigen Stopp-Mutationen in *discs lost<sup>dre-1</sup>* und *discs lost<sup>N-1</sup>* ist dargestellt. Eine C-terminale 8XMYC Markierung des Proteins führt zu der Deletion der letzten 48 Aminosäuren (Pielage et al., 2003; Stork, 2002).

### 3.1.1.6 Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse



**Abb. 7: Der  $\alpha$ -spectrin Locus.** Die Gene  $\alpha$ -spectrin und CG32315 lassen sich genetisch trennen. Bei dem Gen CG32315 handelt es sich um *discs lost*. \*: Die Komplementationsgruppe *no name yet\** betrifft wahrscheinlich CG13933, CG12018, CG2021 oder mRpL46.

Die genetische Analyse zeigt, dass *discs lost* durch das im Intron von  $\alpha$ -spectrin liegende Gen CG32315 kodiert wird. Die beiden Gene  $\alpha$ -spectrin und *discs lost* teilen sich den gleichen Promotor und das erste nicht translatierte Exon, bilden aber zwei getrennte Komplementationsgruppen. Die im ersten Intron von  $\alpha$ -spectrin/discs lost inserierten P-Elemente sind Doppelmutanten für  $\alpha$ -spec und *discs lost*. Es gibt somit kein Indiz für die Existenz cis-regulatorischer Enhancer-Elemente für das proximal gelegene *patj*. Da das EMS Allel *discs lost<sup>dre-1</sup>* nicht das Gen *patj*, sondern

## Ergebnisse

*CG32315 (discs lost)* betrifft, sind damit bis auf Defizienzen wie z.B. die Defizienz *Df(3L)My10* keine Allele von *patj* vorhanden. Die Komplementationsgruppe *nny* liegt im Bereich der *P[klop3]* assoziierten Defizienz. In diesem Bereich liegen die Gene *CG2021*, *CG12018*, *mRpL46* und zumindest der Promotorbereich von *CG13933*. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 graphisch zusammengefasst.

### 3.1.2 Analyse von *discs lost*

#### 3.1.2.1 Das *Discs lost* Protein

Das Gen *discs lost* kodiert für ein 1240 Aminosäuren großes Protein von ca. 140 kDa. Die Sequenz zeigt keine signifikante Homologie zu bekannten Proteindomänen, allerdings gibt es ähnliche Proteine in anderen Spezies. Am nächsten verwandt ist das Homolog aus *Drosophila pseudoobscura* mit ca. 61% identischen Aminosäuren (Abb. 8.) Auch in Vertebraten gibt es ein Homolog, welches zwar nur ca. 25% Sequenzidentität aufweist, diese erstreckt sich aber über die gesamte Länge des Proteins (Dgany et al., 2002; Tatusova and Madden, 1999). Im Menschen wurde dieses Homolog als Codanin-1 beschrieben, einem Protein, welches in der seltenen Erbkrankheit Congenital Dyserythropoietic Anaemia type-1 (CDA-1) mutiert ist (Dagny et al., 2002). Die Krankheit ist gekennzeichnet durch eine Blutanämie, die durch unzureichende Proliferation der Erythroblasten verursacht wird (Wickramasinghe, 1997; Wickramasinghe and Pippard, 1986).

Welche Funktion *discs lost* in *Drosophila* ausführt ist bisher nicht bekannt. Um diese Frage zu klären, wurden weitere Untersuchungen zu *discs lost* vorgenommen.

#### 3.1.2.2 Die mRNA Expression von *discs lost*

Die ubiquitäre Expression von *discs lost* mRNA im Embryo wurde bereits demonstriert (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003). Mit einer spezifischen DIG-markierten *discs lost* antisense Sonde wurde nun auch das larvale Expressionsmuster untersucht. Dabei zeigte sich, dass *discs lost* auch während larvaler Stadien weitgehend ubiquitär exprimiert wird. So konnte in L3 Larven neben einem geringen Expressionslevel in nicht proliferierenden Geweben wie dem Darm, Fettkörper oder Speicheldrüsen eine starke Expression vor allem in den Imaginalscheiben detektiert werden (Abb. 9). In der Augen-Antennenimaginalscheibe

```

D. mel. dlt M T A E L K A S D T E M T K P E E R H L L Q L L A O L E K V P H - - - - - H O L E O K F V A Y F K K V V G K G D N Q S N C T L E D F A T Y F L G A L R O S T K R Y Y Y - - - - - S Q 79
D. pseudo. dlt K V N R L - - - - - E E N Q L Q R L L T N L E N V P R - - - - - V O L E F K F V S L F K K G - - - - - K T C H L E D F A V Y F L L A A V R O H T E O H R - - - - - G S 63
H.s. Codanin 1 M A A V L - - - - - E S - - - - - L L R E E V S V A A V V R W I A R S T Q G S E D N A G E A A A L S S L R A L - - - - - A K - - - - - E F V P F L L N F L R E O S S R V I P Q G P P T P A K T P G A 78

D. mel. dlt L S E T P V F E L T P I H Q L K P - - - - - E V A D V V K E E E Q Q O L N E S S I L S R S S C M S S T S N T T P A P Q O P O G R R S T G S - - - - - G A O F C S T P - - - - - N R S G G G A G G - - - - - G H S I T C L G 170
D. pseudo. dlt B E T E T F K R C L T P V R O F K P L L E S E D L F N A S E H N Q S A A G - - - - - A T S S M S T P V R R P S O G R R S A G G A P G S R O F C S T P Q S A N R S G G G A A G G D R G H S F C L G 153
H.s. Codanin 1 A A L L E G K R F G G P R G S S G - - - - - A R S Q L F E P T E A O S T A A E - - - - - A P L A R R G G R R P G C P A S E R G G R - - - - - G L E - - - - - E - - - - - G V S G E D L E G A - - - - - G - - - - - 150

D. mel. dlt N F L V N T P I O S H O R S K K K I T F P K Q O O N G - - - - - H A S L G S G T G A A T L P O K P R R R V L P M T I S K N V S A S S F G D T S S F S N E N N F W R I S O S S E L F D R S O G E A A L E 265
D. pseudo. dlt D F L V T P T O G H O R S T K K K I T P O Q O O Q O - - - - - Q T - - - - - A G V L Q A K P R R R V L P M T I S K N V S A S S F G D T S S F S N E N N L W R I S O S S E L F D R S O G A A L D 241
H.s. Codanin 1 R R L N C G G P S R P S L L L S D F E N L E S L E E F P P V G S V - - - - - P G H T C T K P S R R L N E T P V S E E R S L S K P - - - - - K C F T - - - - - S P F T S C V F S S O P S A L D 232

D. mel. dlt M E A R - - - - - K F L L L K K Q E I K S E A P V N V S Q O E R T P E - - - - - D E V F P E E - - - - - A S L E G V A N A N H L Q L L S T I Y S L L M D L N L V P N V L R E L S F V 341
D. pseudo. dlt M E A R - - - - - K S L L L H K O E I K S E A P V S V - - - - - F E R G Q E - - - - - D E V S S M O E P V P V K L E P V K S P G O L O G L S A I Y C O L M D L N L V P N V L G E L S F V 319
H.s. Codanin 1 T S V W L G L G L P P G C R S L Q E E E E M L R K E R S K O L O - - - - - Q S P T F T C T P E L G S P L P S R T G S L T D E - - - - - P A D T A R V S S R O R L E L E V A L V Y S S C T A E N L V P N L D F L E L F F V 328

D. mel. dlt V H L L N V R D - - - - - F G Q S F V K S Y - - - - - V E S A L E G L T - - - - - O H K S - - - - - C V Y F A A K L L E N Q K L L L Q L D K R T L S V L L Q N E R L S L L P Q G V V Q E L E T H G Q R R O D - - - - - 424
D. pseudo. dlt M O L L N V H D - - - - - S D V T P S Q A V K E L D L G T P L Q R L G - - - - - L Y K N - - - - - C Y P A L Q L L E H Q Q Y L L L Q L D R K S L C T I L L Q H E R L G L L P Q P L V O O L E E S C H R K O E L A K K E D 412
H.s. Codanin 1 P O L L T A R R M V T A K D S D P E L - - - - - S E A V L D S L E S P L F Q S I H D C V F P A V Q V L E C H F O V L S N L D K G T E R K L A E N E R L L C F S P A L Q E R E R A A V - - - - - E - - - - - 414

D. mel. dlt S T I F A M D - T S S S S Q O N V Y Y H E M D S R D N F P S O N E F G A F K S Q R D L F Y K A L K R W E V S H L N R G F N P P S E L G F R I M D I Y K K S E H F V N M H H A K L F V N Q L L - - - - - 520
D. pseudo. dlt S S S S S T L A S P G S Q O N V Y Y H E M D S R D N F P N O N E F G A F K S Q R D L F Y K A K L W E A T H L N R G F P N E L E H V R A I P K I S E H A V N M A H F A K L F V S Q L L - - - - - 509
H.s. Codanin 1 S V A K V F L - V M P F S T Q A V F Q E E D M R A N F S S D R A E H T F K K O R D V P Y E L R E W E D H H E E P G D E E G L G S R I R A M V G Q L S A C H C H F V L F Q K O L L Q M C 513

D. mel. dlt - - - - - I S A F E T T E S P E E L G L K L D L R H N K L - - - - - A Q R L V T S S S S V E G - - - - - Q P P R S Q A F F R D F I V C S S V A F L V H L K L E L F V Q L W R R N D S T F D L L Q L T D D V 608
D. pseudo. dlt - - - - - I S G S E T T E S P E E L G L K L D L R L N R L - - - - - A Q R L V T S S S S V E D - - - - - Q P P R S Q A F F R D F I S D C S S M A F L V Q L K L A L Y V Q L W R N D S T F E L K G E L S F V 597
H.s. Codanin 1 Q S P G G A G G T V L G E A P D V L S W - L G A D K L G R L L W R L Q E R L M A P S S G G G C P P P T F P P G C Q G F F R D F I S A S S F Q F N Q H L M D S L S L K T Q E I R G L A T P Q H E F N D E D 612

D. mel. dlt A V E E Q S - - - - - A Q Q G - P Y I V R V Q T M A N M L I L A K F L G Y V T V M P F S G T T C H G N P T P P Y L C P O O L Q L R N H E R P D F N L R E I L E R S M R O G K L L I T L P W L V Q Y L A M L D L 705
D. pseudo. dlt V E E R P - - - - - S O Q G G P F I V R A Q T M A N M L I L A K F L G Y V T T L P Y R C S G Q B O S O - - - - - V C O O O L O L R S H E R P D F N L R E L L E R S M V N G K L L I T L P W L V Q Y L V M L D L 692
H.s. Codanin 1 G E S P V D W Q G E R K - Q F A V - - - - - V L S I R L L A K F L G F V A F L P Y R C P E P P E T G E - - - - - L O D S I L A L R S O R E V E L D V N T L L Q R G I Q A R R A V T V W B L V E F L S P A D H 705

D. mel. dlt V S L H L P D A V A T L E L L Y G L Y A D R M A K L O P A A V - F I A R - - - - - S C L G W L L D A Q P Q L V N G Y Y N Y R A O E A C V G S I S A I V D I C L K D L S C H D K S H A P L D E L L P V A 800
D. pseudo. dlt A A Q L P N T L A T L E L L Y A A M A F A E K L O P G A V - F V A R - - - - - S C L G W L L E A O P H L V S G Y Y S Y R A L E - - - - - M G G N A A V V S G S S F R S L E S H V Q M E L L P V A 785
H.s. Codanin 1 V E L L E Y Y R D I E T L L R L H R S V L S Q E S E G K M C F L N K L L L L A V L G W L E A P T V E D L G Y F - - - - - L E - - - - - E G F S Y A F E V D T V A P E H G L D A R A F V D - Q Q L L Y T C 798

D. mel. dlt C P E L L E F R V S I T P S R Q A - - - - - S G R F R Y I T T R L E Q L Q O N - - - - - D S S K D A I V A - S E L S P A E Q O O R K L D P A M L Q S O N A S T R R L I E F V T E R T F K C V V K D A Q Q 892
D. pseudo. dlt C P Y L H E F R V N I T P S R O S Q S I G R S G R F R Y I T T R L E Q L N O G A T S T A Q S V V A C V E L S P A E Q O O R K L D A F L H S O N A S T R R L I P F V T E R C T F K C V V K D A Q Q 884
H.s. Codanin 1 C P Y L G E R - K L L A S W V S G S G R S G C F E M - - - - - R K - - - - - T P T T T S L G A - Q P S O T S Q L L A Q L A Q A F H N O P F S L R R T V E V A E R T G S N C V - K H I K A 883

D. mel. dlt H I L L P S K A S A D A K V N E I K S T M L E E V F O E L H E I P O D A R E N A C Q R W K F E V H O M L D - - - - - R R I E S S I D G L L P S S T N A V L R S T Y A H L I R V Q A Q T O L Q Q W L O 985
D. pseudo. dlt Q I L L P S K A A A D G R V N E I N S T O Y Q V F G D I Q Q I Y Q E A K S Q A C O R W A T O V F R M L T - - - - - E R I E O S H G A L L P D S T N E V L R A T Y A Q L I R G O A O T O L Q H W L O 977
H.s. Codanin 1 T I V A D L V R Q A E S L L O E Q L V T O C B E G - G D P A Q L L E I L C S O L C P - - - - - H G A Q A L A L G R E F C Q R S P F R A V R A L L P B E T P A A V L S A E N I A V G H A T E K A C A W L S 978

D. mel. dlt S V L Q S T F Y H G D L Q E L A T K V C N N R N K A D A A A A G G G G - - - - - S E E L Q L S P D I G F S L S E F L Y Q L O Q W L H C L S L R - P E Y V G S O E D L A E L L R K A Q K A V L L P 1077
D. pseudo. dlt A N V M O S S F Y Q G D L Q E L A A K V C R A N K N K L E - - - - - T T G G G S - - - - - S N E M H L T L D V G F S L S D M L F Q L O Q W L H C V S L R - P E S V G S A F E L L A L L C O T Q H A V L L T 1067
H.s. Codanin 1 A N T A L I - - - - - R R E V K A A V E R R L R A Q G P E F A A R G E R R G C S R A C E H H A P L P S H L I S E S K D V L - S L A - - - - - V G P R D P D E G V S P E H E O L L C Q L G Q T L - - - - - 1064

D. mel. dlt N P T V P Y H L I G S G L V H L L Q L L I T R K P N F L D K D I T S A S C S V W R Q O O L M D S K A S - P G I F D G L I S S F I Q E M A N S A D S F R M - - - - - L E T L H S M L Q S G A I R 1169
D. pseudo. dlt Q P T V P Y H L I G S G L V R L V Q L L I T R C Q L L T F Q I L S A S C T V W R P O I S A S E F A L P G I F D G L L S V S F I Q E L G N H E C F E R I - - - - - L E T L L T M L E A G V L N 1160
H.s. Codanin 1 - - - - - R C R P L C P F A - - - - - P Q H L K C S E L A S - - - - - L L V A D Q Q P T L G F P A Q - Y R L E R G Q A R R E L M L L S L W K E D F Q G 1127

D. mel. dlt A D H L N E L F M P - - - - - L F A E N W S F V V C M L S E L L Q O O L S L S G - - - - - R - - - - - D S E A H Y A S G D S F - - - - - E D D A K S H L F M E M - - - - - L A D L S R D - 1236
D. pseudo. dlt A D Q F N E L F M P - - - - - L E K E N W S F E V W N A L S Q M L Q O O L S O G N - - - - - F G G G D S N D S K E D I T N S F - - - - - E D D A K S H L F M E M - - - - - L A D L S R D - 1231
H.s. Codanin 1 V P L O L L L S P R N V G L L A D T - R E R P W D L L L F L L R E L V E R G L M G R M - - - - - E I E A O L G S L H O A Q W P G D F A E B L A T L S N L F L A E P H L P E P Q L R A C E L V Q F N R G T 1222

D. mel. dlt - L D N F 1240
D. pseudo. dlt - L D G F 1235
H.s. Codanin 1 V L A C S 1227

```

**Abb. 8: Sequenzvergleich von Discs lost Homologen.** Die Proteinsequenzen der Discs lost Homologe von *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura* und des Menschen (Codanin-1). Schwarz: identische Aminosäuren, Blau: funktionell ähnliche Gruppen. *D. mel.* Discs lost teilt 61% identische Aminosäuren mit dem *D. pseudo.* Homolog, zu Codanin-1 ist es zu 25% identisch. Die Homologie erstreckt sich über das gesamte Protein, wobei das erste Viertel die geringste Übereinstimmung zeigt.

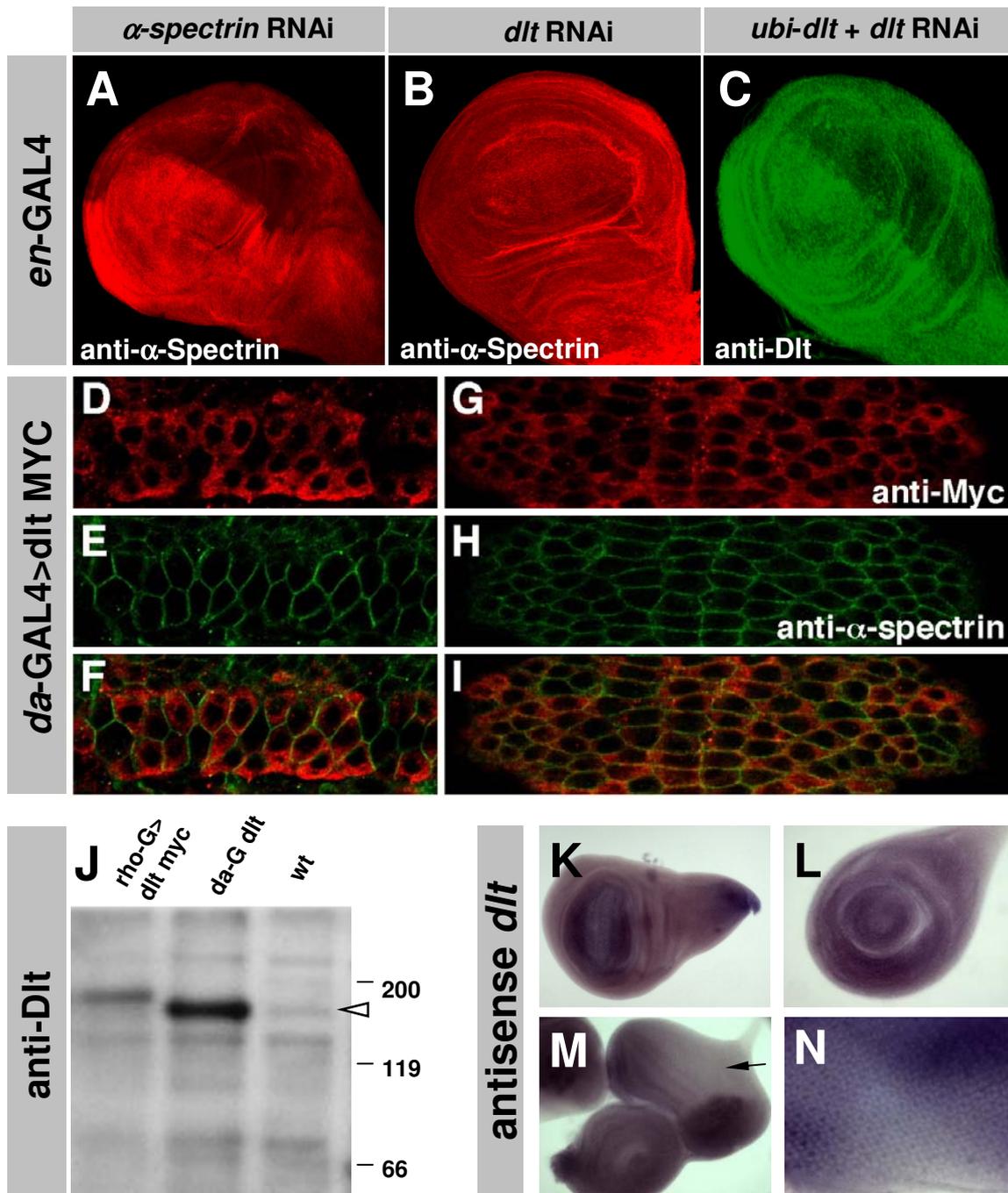
## Ergebnisse

(AIS) fällt auf, dass die *discs lost* Expression in weiten Teilen der Augenscheibe schwächer ausgeprägt ist als im Bereich der zukünftigen Antenne (Abb. 9 M Pfeil). Discs lost ist auch hinter der morphogenetischen Furche in den bereits gebildeten Photorezeptorzellen exprimiert, zeigt hier jedoch schwächere Expressionslevel (Abb. 9 N).

### 3.1.2.3 Die Proteinlokalisierung von Discs lost

Um die subzelluläre Lokalisation von Discs lost zu testen, wurden Antiseren gegen das Protein generiert (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003). Ein Antikörper gegen den N-Terminus von Discs lost erkennt das endogene Protein aus embryonalen Lysaten zumindest schwach im Western Blot (Abb. 9 Pfeilspitze in J). Allerdings werden noch diverse andere Proteinbanden markiert. Um die Spezifität weiter zu testen, wurden auch Lysate getestet in denen wildtypisches oder MYC markiertes Discs lost über das Gal4 UAS System (Brand and Perrimon, 1993) überexprimiert wurde. In beiden Fällen wird eine Proteinbande in der richtigen Höhe erkannt (Abb. 9 J). Durch das Anhängen des MYC-„Tags“ ist das Discs lost-MYC Protein um ca. 100 Aminosäuren größer als die wildtypische Version und läuft im Gel entsprechend höher.

Mit dem Discs lost Antikörper wurden auch wildtypische Embryonen und L3 Imaginalscheiben gefärbt. Allerdings zeigte sich hier kein spezifisches Signal für das endogene Discs lost. In der Überexpression wird das Protein allerdings erkannt. Es zeigt sich eine cytoplasmatische Lokalisation des Proteins (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003). In Abbildung 9 D-I ist die Lokalisation des überexprimierten MYC markierten Discs lost Proteins gezeigt. Das Konstrukt wurde ubiquitär mittels *daughterless*-Gal4 im Embryo exprimiert, mit einem MYC Antikörper detektiert und die Zellen der Speicheldrüse (Abb. 9 D-F) und der Epidermis (Abb. 9 G-I) untersucht. Dabei zeigt sich deutlich eine cytoplasmatische Lokalisation. Es findet sich weder Discs lost-MYC Protein im Kern noch scheint es eine Rekrutierung zur Zellmembran ( $\alpha$ -Spectrin markiert) oder in spezifische Organellen zu geben. Die subzelluläre Lokalisation des Discs lost-MYC Proteins muss die wildtypische Lokalisation mit einschließen, da das Protein den *discs lost* Phänotyp retten kann (siehe Abschnitt 3.1.1.4). Das Discs lost-MYC Protein lokalisiert dabei vergleichbar wie überexprimiertes, wildtypisches Discs lost ((Pielage, 2002) Abb. 9 D-I; vgl. Abb. 9 C)



**Abb. 9: Discs lost lokalisiert im Cytoplasma und ist ubiquitär exprimiert.** (A-C) Flügelimaginalscheiben mit *enGal4>UAS* RNAi Expression. (A) *α-spectrin*-RNAi reduziert die  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge. (B) *dlt*-RNAi reduziert die  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge nicht, (C) überexprimiertes Dlt wird aber spezifisch reduziert. (D-I) Embryonale Überexpression von *dlt*-MYC. Dlt-MYC lokalisiert im Cytoplasma, (D-F) Speicheldrüse, (G-I) Epidermis. Die Zellgrenzen sind durch anti  $\alpha$ -Spectrin dargestellt. (J) anti-Dlt Westernblot an embryonalen Lysaten. Überexpressionen von Dlt-MYC und Dlt werden deutlich erkannt. Auch im Wildtyp zeigt sich eine schwache Dlt Bande (Peilspitze). (K-N) *in situ* Hybridisierung mit *antisense dlt* RNA. *dlt* ist ubiquitär und verstärkt in Imaginalscheiben exprimiert. In der Augenscheibe zeigt der posteriore Bereich schwächere *dlt* Level (Pfeil). *dlt* ist schwach in differenzierten Photorezeptorzellen exprimiert (N).

### 3.1.2.4 *discs lost* RNAi

Da es die Möglichkeit gibt, Gene über die RNA-interference Methode (Fire et al., 1998; Gunsalus and Piano, 2005; Kennerdell and Carthew, 1998) auszuschalten, wurden *discs lost* UAS RNAi Konstrukte generiert (Pielage, 2002). Dazu wurde ein *discs lost* spezifisches Fragment der cDNA amplifiziert und antiparallel, in tandem in den pWiz Vector kloniert (Lee and Carthew, 2003). Dieser trägt neben UAS Sequenzen noch das 2. *white* Intron, das zwischen den entgegengesetzt orientierten *discs lost* Fragmenten liegt. Über die UAS Sequenzen kann dann mittels Gal4 ein RNA Strang exprimiert werden, der komplementäre *discs lost* Sequenzen enthält, die durch das zweite Intron des *white* Gens getrennt sind. Dieses wird herausgespleißt und die komplementären Stränge können sich zu einer doppelsträngigen RNA zusammenlegen. und so über „RNA interference“ zur Inaktivierung von Genen führen (Lee and Carthew, 2003).

Mittels eines Antiserums, das sich gegen das Discs lost Protein richtet, wurde die Funktionalität der *discs lost* UAS-RNAi Konstrukte überprüft (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003). Da der Antikörper das endogene Protein nicht spezifisch erkennt, wurde mit Hilfe des *ubi-discs lost* Konstruktes (*ubi-CG32315*) Discs lost in der Flügelscheibe exprimiert, so dass es sich über einem Discs lost Antikörper detektieren ließ. In diesem Hintergrund wurde nun über einen *engrailed*-Gal4 Treiber im posterioren Kompartiment der Flügelscheibe das UAS *discs lost* RNAi Konstrukt (UAS *discs lost*<sup>RNAi</sup>) exprimiert. Dies führte zu einer spezifischen Herabregulierung der Discs lost Überexpression im posterioren Kompartiment (Abb. 9 C). Dies zeigt zum einen die Spezifität des Antikörpers und zum anderen die Funktionalität des *discs lost* RNAi-Konstruktes.

Es wurde auch getestet, ob *discs lost* RNAi einen Einfluss auf  $\alpha$ -Spectrin Expressionslevel hat. Dazu wurde das RNAi Konstrukt mittels *engrailed*-Gal4 in einem sonst wildtypischen Hintergrund exprimiert. Diese *discs lost* RNAi Expression führte aber nie zu einer Abnahme des  $\alpha$ -Spectrin Proteins im posterioren Kompartiment der Flügelscheibe (Abb. 9 B). Dies zeigt zum einen, dass es sich bei *discs lost* nicht um einen Regulator der  $\alpha$ -Spectrin Expressionslevel handelt (siehe Einleitung). Zum anderen wird hier die Spezifität des *discs lost* RNAi Konstruktes demonstriert, welches nur die *discs lost* mRNA degradiert und die  *$\alpha$ -spectrin* mRNA, die ja aus der gleichen prä-mRNA gespleißt wird, intakt lässt. (Van Roessel et al., 2002; Yang et al., 2000)

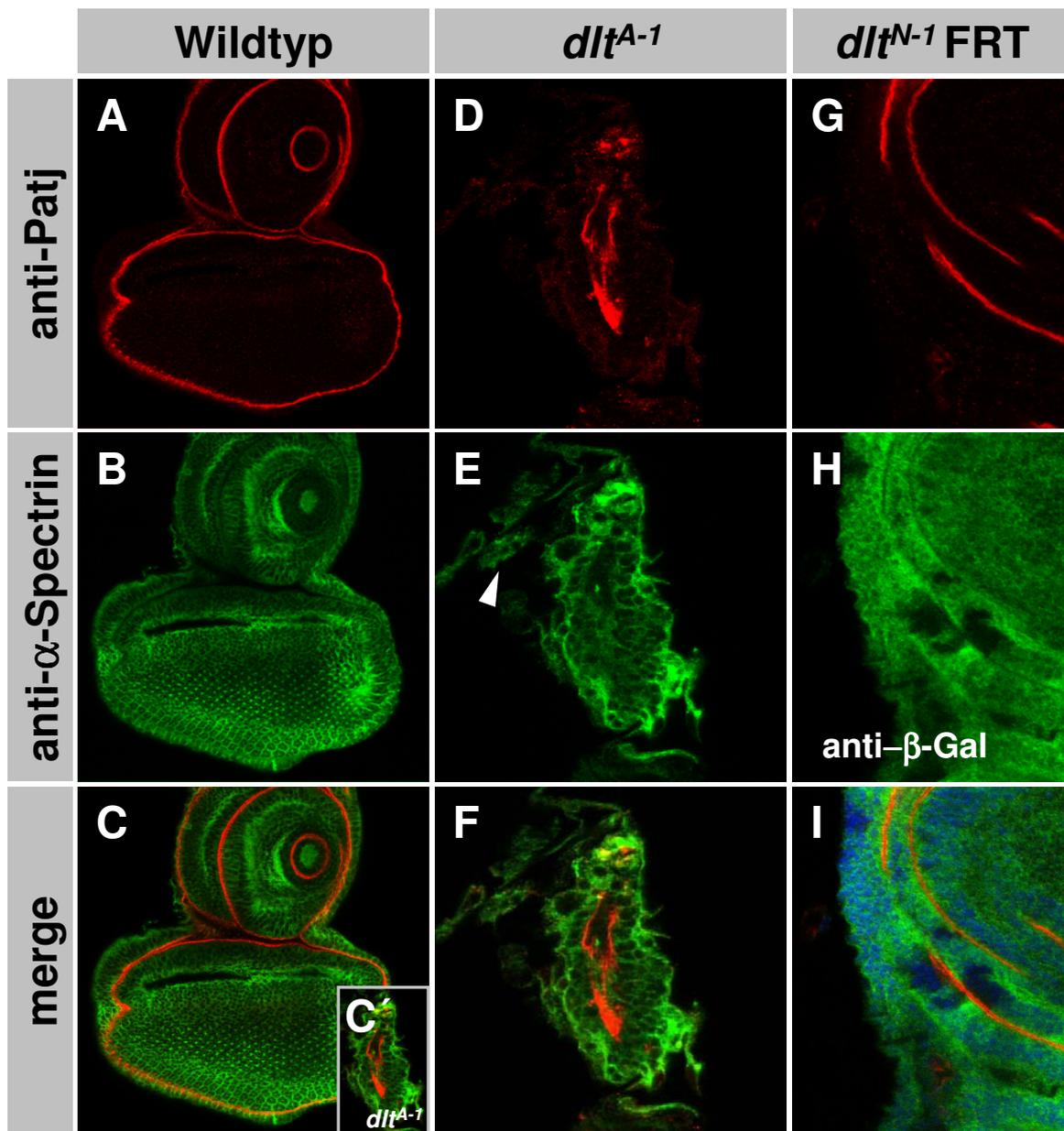
### 3.1.2.5 Klassifizierung der *discs lost* Allele

Alle *discs lost* Allele zeigen in trans zu der Defizienz *Df(3L)Aprt32* pupale Letalität (siehe Tab. 5). In den Allelen kommt es zu einer variablen Reduktion der Größe der Imaginalscheiben. Die Allele *discs lost<sup>N-1</sup>* und *discs lost<sup>O-2</sup>* sind verhältnismäßig schwach. Sie zeigen in trans zur Defizienz eine spät pupale Letalität. Sie sterben im „Pharate“-Stadium, entwickeln also Beine, Flügel, Thorax und Augen. Allerdings zeigt sich hier häufig eine Reduktion der Größe der Augen und die Beine und Flügel sind oft deformiert.

Die Allele *discs lost<sup>A-1</sup>* und *discs lost<sup>C-1</sup>* zeigen stärkere Phänotypen. Hier kommt es nach der Verpuppung häufig zu einem Stopp in der Entwicklung und anschließender Histolyse des Gewebes.

Alle Allele zeigen einen schwächeren Phänotyp, wenn sie in trans zu einer Defizienz analysiert werden, als in Homozygose. Das Allel *A-1* trägt keine weiteren Letalmutationen, da es durch *ubi-discs lost* zu voller Vitalität gerettet werden kann (Tab. 8). Obwohl *A-1* also keine weiteren Letalmutationen trägt, wird der Phänotyp in trans zu *Df(3L)Aprt32* im Vergleich zur *A-1* Homozygose abgeschwächt. Es kommt zu einer späteren Histolyse der Puppen und die Augenimaginalscheiben der L3 Larven sind weniger stark reduziert (Daten nicht gezeigt). Wie es zu so einem Verhalten kommen kann ist zurzeit unklar. Es könnte sich bei *A-1* um eine dominant negative Mutation handeln, allerdings ist dies unwahrscheinlich, da *A-1* zu voller Vitalität gerettet werden kann. Auch zeigen die anderen *discs lost* Allele ein ähnliches Verhalten.

Über *Df(3L)My10* wurde versucht eine *discs lost* defiziente Situation zu untersuchen. *Df(3L)My10* deletiert die Gene *α-spectrin*, *discs lost*, *cdc37*, *patj* und noch zwei weitere Transkriptionseinheiten (*CG12020* und *jtbr*; siehe Abb. 1; *jtbr* ist nicht dargestellt). Über ein genomisches Fragment, das vollständig *cdc37* und *CG12020* enthält (*P[cdc37]*, (Cutforth and Rubin, 1994)) und ein *ubi-α-spectrin* Konstrukt (Lee et al., 1993) wurde die Defizienz zu pupaler Letalität gerettet (vgl. Abb. 11). In so geretteten L3 Larven wurden die Augenantennenimaginalscheiben analysiert. Sie zeigen eine ähnlich starke Reduktion wie homozygote *A-1* oder *C-1* Scheiben (Abb. 11 D-F; vgl. Abb. 10 D-F). Dies spricht dafür, dass es sich bei *A-1* um eine Nullmutante handelt. Es wurde eine Abfolge der Stärke der verschiedenen *discs lost* Allele aufgestellt:



**Abb. 10: *discs lost* führt zu einer Reduktion der Imaginalscheiben.** (A-C) Wildtyp L3 Augen-Antennenimaginalscheibe. (D-F) Die *dlt<sup>A-1</sup>* L3 Augen-Antennenimaginalscheibe ist in ihrer Größe sehr stark reduziert, der Antennenanteil ist zu einer fädigen Struktur degeneriert (Pfeilspitze, E). C' zeigt *dlt<sup>A-1</sup>* Imaginalscheibe in gleicher Vergrößerung wie die Wildtyp Scheibe (C). Zellgrenzen sind mit dem mAb anti- $\alpha$ -Spectrin dargestellt, apikale Membranen mit dem pAb anti-Patj. Patj ist in *dlt<sup>A-1</sup>* Scheiben weder reduziert noch fehllokalisiert. Auch in *dlt<sup>N-1</sup>* Klonen in der Flügelscheibe (G-I) ist Patj nicht fehllokalisiert. *dlt* mutante Bereiche sind durch die Abwesenheit von  $\beta$ -Galaktosidase (G und I) zu identifizieren.

Ergebnisse

**A-1** > **C-1** > **dre-1** > **O-2** > **N-2** wobei angenommen wird, dass es sich bei **A-1** und **C-1** um Nullmutationen oder starke, hypomorphe Mutationen handelt.

### 3.1.2.6 Der *discs lost* Phänotyp

Für die Analyse des *discs lost* Phänotyps wurden *discs lost*<sup>A-1</sup> bzw. *ubi- $\alpha$ -spectrin*; *P[cdc37]*, *Df(3L)My10* L3 Larven untersucht. Wie bereits beschrieben, zeigen diese *discs lost* Mutanten eine deutliche Reduktion in der Größe der Imaginalscheiben. Die Bein und Flügelscheiben sind in der Regel so stark betroffen, dass es schwierig ist sie zu präparieren. Da die Augen-Antennenimaginalscheibe leichter zu identifizieren ist, wurde die Analyse hier durchgeführt.

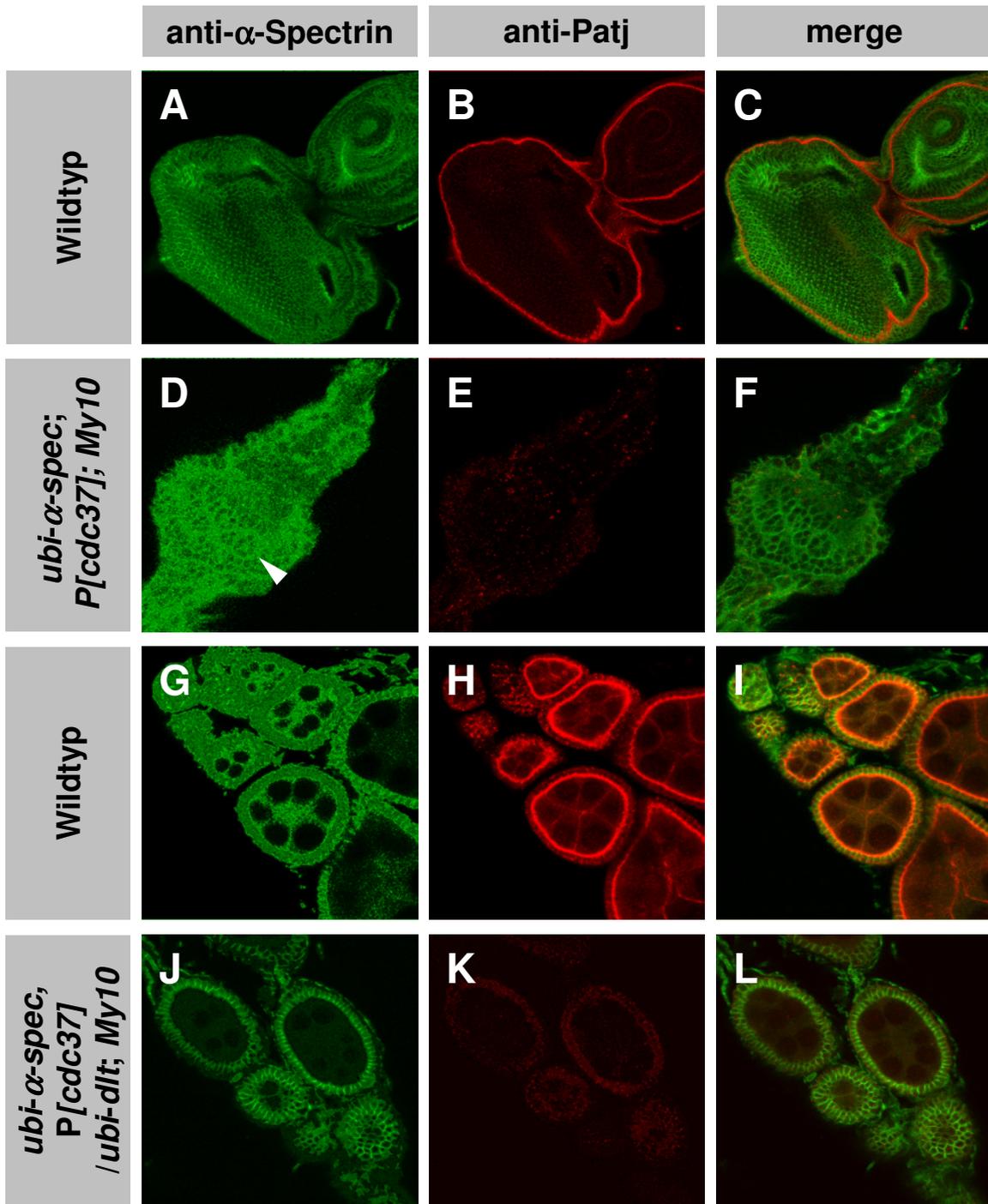
Die Reduktion der Größe der Augen-Antennenimaginalscheibe war variabel, konnte aber so weit gehen, dass die Scheibe nur ca. 1/8 bis 1/10 der Größe einer wildtypischen Augen-Antennenimaginalscheibe erreichte (Abb. 10 C und C'). Der Antennenteil scheint deutlich stärker betroffen zu sein als der Augen-Anteil (Abb. 10 D-F, Abb. 11 D-F; Abb. 16 F). Dieser kann bis zu einer fädigen Struktur degenerieren (Abb. 10 E Pfeilspitze). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Reste des Peripodialepithels.

Je nach Stärke des Phänotyps kann es im Augenanteil noch zu einer sichtbaren Differenzierung von Photorezeptoren kommen. Die sich differenzierenden Photorezeptorcluster sind klar zu erkennen (Abb. 11 D, Pfeilspitze). Auch zeigt eine Antikörperfärbung mit einem  $\alpha$ -Spectrin Antikörper (mAb 3A9 Developmental Studies Hybridoma Bank) in *discs lost* Mutanten die normale Verteilung und Expressionsstärke  $\alpha$ -Spectrins. Dies zeigt neben den UAS *discs lost* RNAi Daten, dass *discs lost* keinen Regulator von  *$\alpha$ -spectrin* kodiert.

### 3.1.2.7 Klonale Analyse von *discs lost*

Um die Rolle von *discs lost* in späteren Stadien und in adulten Geweben zu untersuchen, wurde eine klonale Analyse durchgeführt. Dazu wurden die *discs lost* Allele **A-1**, **C-1**, **N-1**, **O-2** und **dre-1** auf ein FRT80B Chromosom rekombiniert. Vermittelt durch eine ortsspezifische Rekombinase (Flipase) kann mitotische Rekombination mit hoher Effizienz induziert werden (Xu and Rubin, 1993).

Für die *discs lost* FRT Chromosomen wurde mitotische Rekombination mittels einer Flipase induziert, die unter der Kontrolle des *eyeless* Promotors steht (*eyFLP*; (Newsome et al., 2000)). Damit lassen sich mutante Klone spezifisch in der Augen-



**Abb. 11: Partielle und vollständige *Df(3L)My10* Rettung.** Eine partielle Rettung zu pupaler Letalität der *My10* Defizienz über *ubi- $\alpha$ -spec* und *P[cdc37]* zeigt reduzierte Größe der Imaginalscheiben (D-E). Zum Teil können noch Photorezeptoren differenzieren und die entsprechenden Cluster sind deutlich zu erkennen (D, Pfeilspitze). Die mutante Scheibe ist gegenüber dem Wildtyp (A-C) deutlich vergrößert dargestellt. Patj ist in der mutanten Situation nicht exprimiert (E). *Df(3L)My10* wird mit den Konstrukten *ubi- $\alpha$ -spec*, *P[cdc37]* und *ubi-dlt* vollständig gerettet (J-L). In den geretteten Fliegen zeigen die Ovarien wildtypische Morphologie. In diesen Tieren lässt sich Patj nicht nachweisen (J-L).

## Ergebnisse

Antennenimaginalscheibe mit hoher Effizienz induzieren. Um den Anteil an mutantern Klongewebe weiter zu erhöhen, wurde für die Rekombination ein Gegenchromosom mit einer *Minute* (*Rsp*<sup>17</sup>) Mutation verwendet. Dies führt dazu, dass der homozygot „wildtypische“ Zwillingssklon eines Rekombinationsereignisses abstirbt, so dass nur heterozygotes und homozygot mutantes Gewebe zurückbleibt (Ferrus, 1975; Newsome et al., 2000).

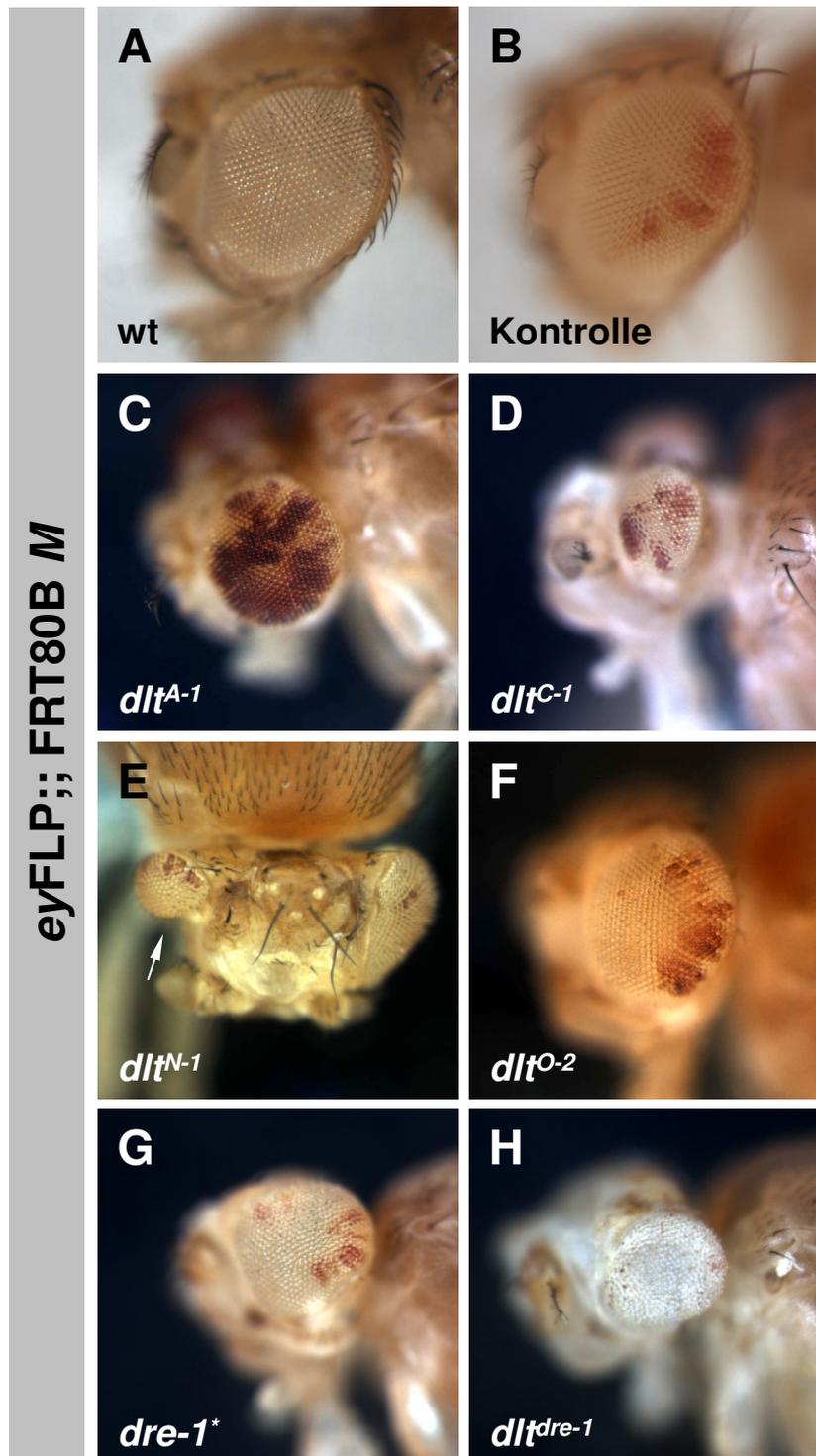
Mittels dieser Technik wurden *discs lost* Mutante Klone im Auge generiert. Die mutanten Zellbereiche können anhand der Abwesenheit des *P[w<sup>+</sup>]* Markers identifiziert werden. Dabei zeigte sich für alle Allele, dass die Augen zum Teil sehr stark verkleinert waren (Abb. 12 C-H). Allerdings ist der Phänotyp sehr variabel. Neben Augen mit fast wildtypischer Größe (Abb. 12 F) traten auch extreme Reduktionen auf, in denen nur noch „knopfartige“ Augen auftraten (Abb. 12 D und E, Pfeil). Die Variabilität geht so weit, dass innerhalb eines Tieres ein Auge fast wildtypische Größe besitzen kann, während das andere sehr stark reduziert ist (Abb. 12 E). Die Anzahl an *white*<sup>+</sup> markierten heterozygoten Zellen blieb in der Regel konstant. Allerdings traten auch wenige Augen auf, in denen die Anzahl der heterozygoten Zellen deutlich erhöht war (Abb. 12 C). Die hier beobachteten Defekte könnten auf mangelnde Proliferation der mutanten Zellen oder deren Absterben zurückzuführen sein.

Insgesamt korrespondierte die Stärke der hier generierten Phänotypen mit der bisher festgestellten Abfolge der Stärke der *discs lost* Allele (siehe Abschnitt 3.1.2.5).

### 3.1.2.8 Möglicher Einfluss von Hintergrundmutationen

Da bei der Methode der mitotischen Rekombination mittels FRT Sequenzen immer ganze Chromosomenarme in Homozygose gebracht werden, sind Hintergrundmutationen besonders kritisch. Sie können den eigentlichen Phänotyp verstärken oder sogar durch völlig andere Phänotypqualitäten überlagern.

Eine Rettung zu völlig wildtypischem Aussehen von *discs lost* Mutanten wurde in Homozygose nur für *discs lost*<sup>A-1</sup> durchgeführt (Tab. 8). Die klonale Analyse zeigte für *discs lost*<sup>A-1</sup> stark verkleinerte Augen, in denen die Anordnung der Ommatidien aber weitgehend normal war. Auch *discs lost*<sup>O-2</sup> zeigt eine weitgehend wildtypische Ordnung der Ommatidien. Dies gilt nicht für die *discs lost* Allele *C-1*, *N-1* und *dre-1*. Sie zeigen alle mehr oder minder starke Defekte in der Anordnung der Ommatidien. Diese Phänotypen könnten auf Hintergrundmutationen zurückzuführen sein. Für die



**Abb. 12: *discs lost* Augenklone führen zu reduzierten Augen.** Die Induktion von *discs lost* Klonen im Auge über eyFLP, FRT80B M führt zu einer variablen Reduktion der Augengröße. Die mutanten Ommatidien sind weiß, während die heterozygoten Bereiche rot markiert sind. (B) zeigt eine Kontrolle mit einem nicht mutanten FRT Chromosom. *dlt<sup>A-1</sup>* (C) und *dlt<sup>C-1</sup>* (D) zeigen die stärkste Reduktion der Augengröße. Der Phänotyp ist sehr variabel und es kann selbst in einem Tier zu extrem unterschiedlichen Ausprägungen kommen (E). Bei *dre-1\** handelt es sich um eine Hintergrundmutation des *dre-1* Chromosoms, die unabhängig von *discs lost* ist, aber auch zu verkleinerten rauhen Augen führt (G). Das *dlt<sup>dre-1</sup>* Chromosom trägt wahrscheinlich ebenfalls diese Mutation (H, siehe Text).

## Ergebnisse

ursprünglichen *dre-1* und *N-1* Chromosomen konnte das Vorhandensein letaler Hintergrundmutationen bereits gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.1.1.2, Tab. 5). Durch die Rekombination bei der Generierung der *discs lost* FRT Chromosomen wurden diese vom *N-1* und *dre-1* Chromosom entfernt. Das FRT Chromosomen für *dre-1* und *N-1* zeigten nun in Homozygose pupale Letalität. Es könnten aber immer noch weitere Mutationen auf dem linken Chromosomenarm vorhanden sein.

Besonders wahrscheinlich scheint dies für das FRT *discs lost<sup>dre-1</sup>* Chromosom zu sein, da es im Vergleich zu den anderen *discs lost* Allelen einen deutlich abweichenden Phänotyp aufweist. Die Ommatidien in *discs lost<sup>dre-1</sup>* FRT *eyFLP/Minute* Augenklonen sind sehr ungleichmäßig angeordnet und das Auge hat insgesamt ein etwas glasiges Aussehen (Abb. 12 H).

Tatsächlich konnte bei der Generierung der FRT Rekombinanten ein Chromosom isoliert werden (*dre-1\**), das pupal letal ist und in Klonen zu deutlich verkleinerten und glasig rauhen Augen führt, aber *discs lost* komplementiert (Abb. 12 G). Es wurden mehrere unabhängige *discs lost<sup>dre-1</sup>* FRT Chromosomen generiert, diese wurden gegen dieses *dre-1\**- Chromosom komplementiert. Hier traten *discs lost<sup>dre-1</sup>* FRT Chromosomen auf, die zwar vital gegen *dre-1\** sind, aber weiterhin einen *discs lost* untypischen rauhe Augenphänotyp zeigen.

Hier scheint es also auf dem linken Chromosomenarm eine Hintergrundmutation zu geben, die für diesen speziellen Augen Phänotyp verantwortlich ist, und in den *discs lost<sup>dre-1</sup>* FRT Chromosomen weiter vorhanden ist. Für weitere klonale Analysen wurden aufgrund möglicher Hintergrundshits immer mindestens zwei unabhängige Allele verwendet, wobei das Hauptaugenmerk auf der Analyse von *discs lost<sup>A-1</sup>* FRT lag, da es erstens ein starkes Allel von *discs lost* ist und es zweitens in Homozygose durch ein *discs lost* Transgen zu Wildtypischen Aussehen rettbar ist (Tab. 8).

### 3.1.2.9 *discs lost* mutante Zellen haben einen Selektionsnachteil

Die *discs lost* typische Reduktion der Augengröße deutet auf einen Defekt der in der Proliferation und/oder dem Überleben der mutanten Zellen hin. Um direkt zu testen, ob der Verlust von *discs lost* einen Selektionsnachteil für die mutanten Zellen nach sich zieht, wurden eine Hitzeschock induzierbare Flipase (*hsFLP*) und ein FRT Gegenchromosom ohne *Minute* Mutation eingesetzt. Die Larven wurden als L1 oder L2 Larven einem Hitzeschock ausgesetzt und so die Expression der Flipase induziert. Die resultierenden Klone wurden dann in der L3 Augen-

## Ergebnisse

Antennenimaginalscheibe oder im adulten Auge analysiert. Um die Klone zu markieren, wurde *arm-lacZ* als zellautonomer Marker verwendet, mutante Zellklone exprimieren kein *lacZ*, während heterozygote Zellen oder homozygot wildtypische Zellen *lacZ* exprimieren. Anhand des verstärkten Signals der  $\beta$ -Galactosidase kann der homozygot wildtypische Zwillingsklon identifiziert werden. In den adulten Augen konnte wiederum *P[white<sup>+</sup>]* als Marker verwendet werden. Die mit dieser Technik generierten Klone sind deutlich kleiner und auch seltener als die mit der *eyFLP-Minute*-Technik.

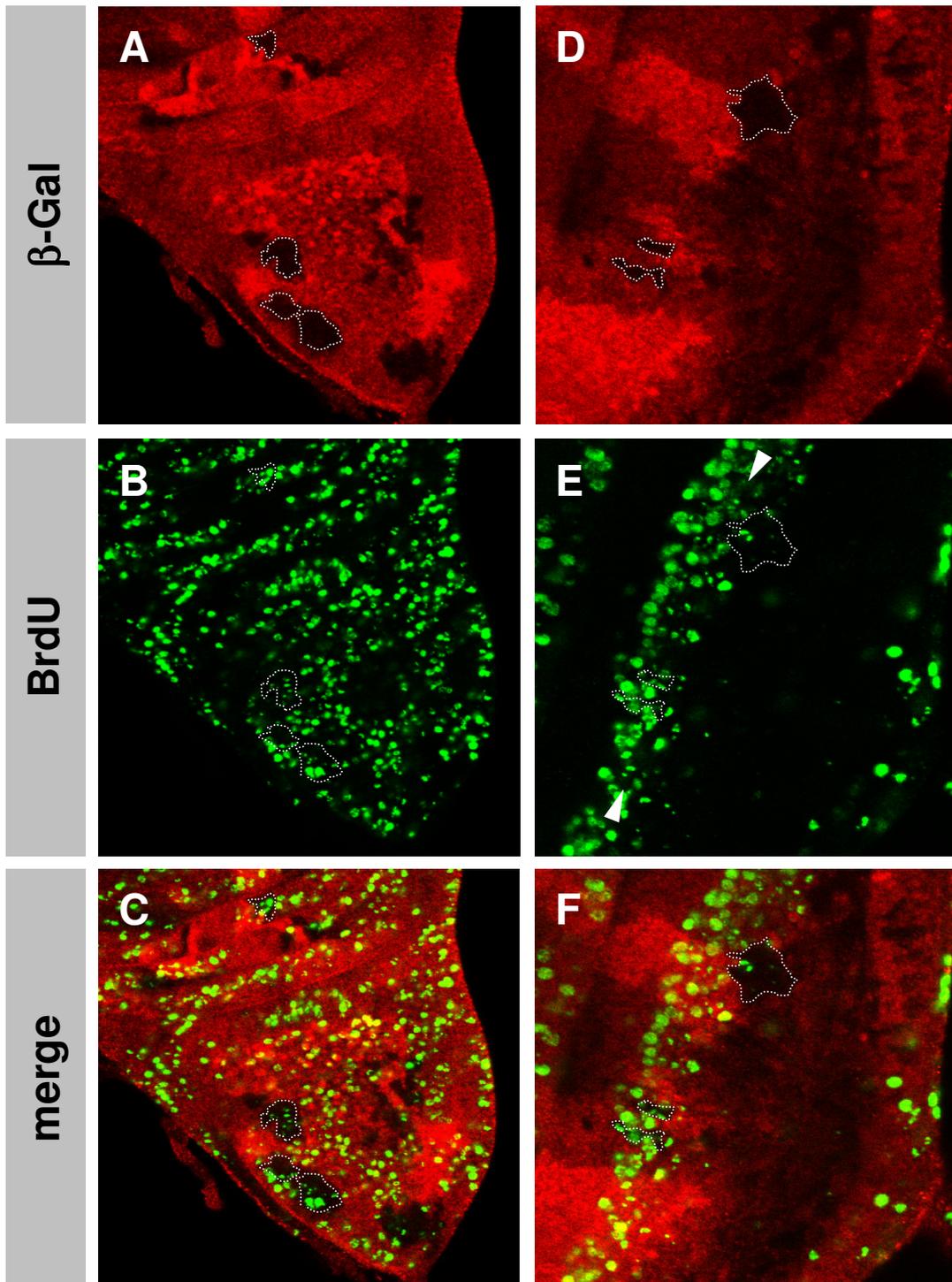
Es zeigte sich, dass in der L3 Larve mutanter und homozygot wildtypischer Zwillingsklon oft eine noch vergleichbare Größe aufwies. Allerdings konnten im Gegensatz zu einer Wildtypkontrolle (FRT80B) unter diesen Bedingungen keine *discs lost* mutante Klone im adulten Auge detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Augen zeigen stärker *white<sup>+</sup>* markierte Wildtyp Zwillingsklone, jedoch keine unmarkierten *discs lost* mutanten Bereiche. Die Augen waren weder rauh noch verkleinert. Die Zellen sterben hier offensichtlich während der pupalen Entwicklung. Obwohl die mutanten Zellen in einem *Minute* Hintergrund zumindest zum Teil bis in die Fliege überleben können, scheinen sie gegenüber wildtypischen Zellen einen entscheidenden Selektionsnachteil während der pupalen Entwicklung zu haben. Da die bereits zum Teil differenzierten, *discs lost* mutanten Photorezeptorzellen nicht im adulten Tier wieder zu finden sind, müssen sie während der Pupalentwicklung absterben.

### **3.1.2.10 DNA Synthese und DNA Gehalt erscheinen normal in *discs lost* mutanten Klonen**

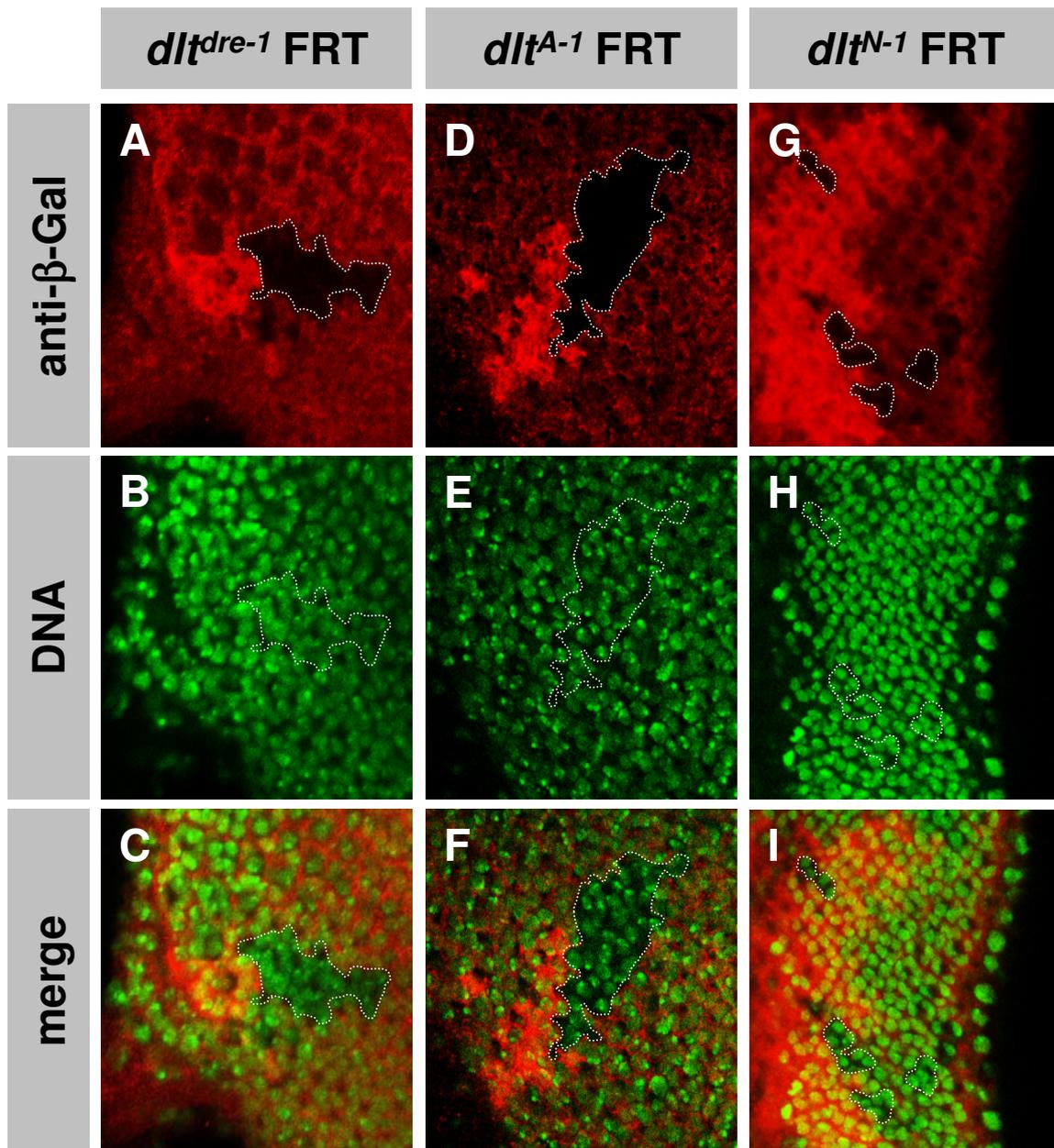
Da für Mutationen im menschlichen *discs lost* Homolog Codanin-1 Defekte in der Chromatinstruktur, der Anzahl der Kerne pro Zelle und im Abschluss der S-Phase beschrieben wurde (Wickramasinghe, 1997; Wickramasinghe, 1998; Wickramasinghe, 2000), wurde zum einen die Fähigkeit zur DNA Synthese über die Inkorporation von 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) und zum anderen der DNA Gehalt der Zellen über eine DNA Färbung überprüft.

Abbildung 13 zeigt *discs lost* Klone in der Flügelscheibe (A-C) und in der Augenimaginalscheibe (D-F). Diese wurden mit Hilfe von *hsFLP* und ohne *Minute* Hintergrund generiert. In der Augenscheibe findet Proliferation vor allem in zwei Zonen statt. Zum einen anterior der morphogenetischen Furche, wo asynchrone

*dlt<sup>dre-1</sup> FRT*



**Abb. 13: *discs lost* mutante Klone zeigen normale BrdU Inkorporation.** Die *dlt<sup>dre-1</sup>* Klone wurden mittels *hsFLP* Technik generiert. Mutantes Gewebe ist an der Abwesenheit von  $\beta$ -Galaktosidase Expression (rot, A; D) zu erkennen. Die ungefähren Grenzen einiger mutanter Zellklone ist gekennzeichnet. Sowohl in der Flügelscheibe (A-C) als auch in der Augenscheibe findet in den Klonen eine Einlagerung des Basenanalogs BrdU in die DNA statt. Die mitotisch aktive Zone („zweite mitotische Welle“) ist durch Pfeilspitzen in E gekennzeichnet.



**Abb. 14: *discs lost* mutante Klone zeigen ein normale DNA Verteilung.**  
 (A-I) Die *discs lost* Klone wurden mittels *hsFLP* Technik generiert und in L3 Augenimaginalscheiben analysiert. Mutantes Gewebe ist an der Abwesenheit von β-Galaktosidase Expression (rot; A, D, G) zu erkennen. Eine stärkere β-Gal Expression markiert die jeweiligen homozygot wildtypischen Zwillingklone. Die ungefähren Grenzen einiger mutanter Klone sind markiert. Die DNA wurde über Yoyo-1 markiert (B, E, H). In den *discs lost* Klonen kommt es keiner drastischen Veränderung des DNA Gehalts gegenüber dem umgebenden Wildtypgewebe.

## Ergebnisse

Zellteilungen auftreten und zum anderen direkt posterior der Furche, wo es eine Zone synchroner Zellteilung gibt. Man spricht hier von der so genannten zweiten mitotischen Welle (Abb. 13 E Pfeilspitzen). Die Proliferation findet in der Flügelscheibe nicht in solch zeitlich und räumlich distinkten Bereichen statt (Abb. 13 B). In beiden Geweben scheint die Inkorporation von BrdU in den *discs lost* mutanten Zellklonen aber genauso effektiv zu sein wie in den umgebenden Wildtypzellen (Abb. 13).

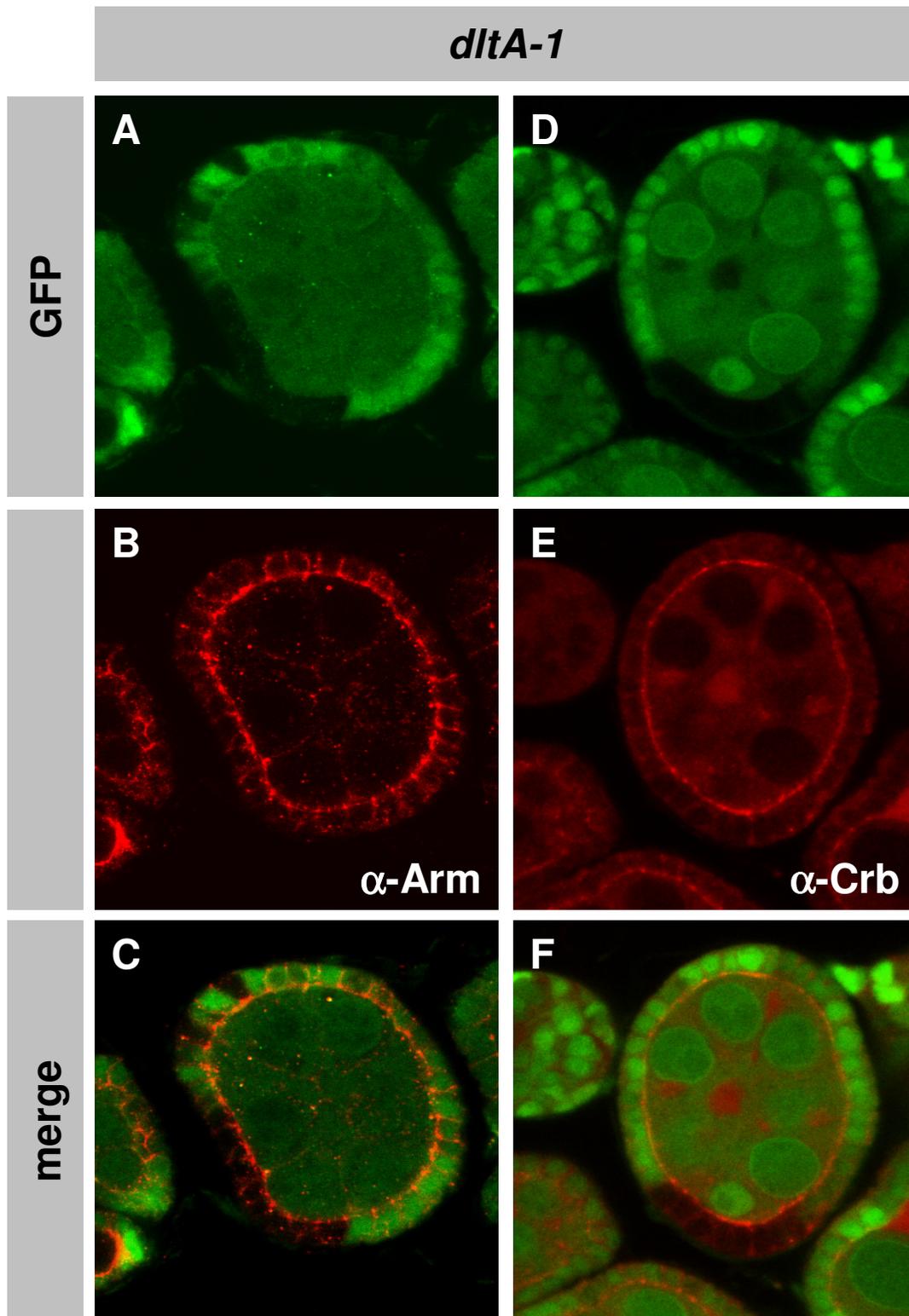
Auch der DNA Gehalt und die Anzahl der Kerne ist in *discs lost* mutanten Klonen normal. Abbildung 14 zeigt eine Yoyo-1 DNA Färbung an *discs lost* mutanten Zellklonen in der Augenscheibe. Mit dieser Technik ließ sich für kein Allel ein Unterschied im DNA Gehalt der mutanten Zellen feststellen. Auch schienen keine mehrkernigen Zellen aufzutreten. Dieser Befund wurde auch in *discs lost* Klonen der Follikelzellen des Ovars überprüft. Auch hier traten keine multinuklären Zellen auf (Daten nicht gezeigt).

### **3.1.2.11 Zellpolarität ist in *discs lost* mutanten Klonen nicht beeinträchtigt**

Da *discs lost* ursprünglich mit epithelialer Zellpolarität in Zusammenhang gebracht wurde (Bhat et al., 1999; Tanentzapf et al., 2000), wurden hier *discs lost* Mutanten neuerlich auf eine eventuelle Fehlverteilung von Polaritätsmakern untersucht.

Dazu wurden Augenimaginalscheiben von *discs lost* Mutanten L3 Larven verwendet. Dabei zeigte sich, dass selbst in extrem stark reduzierten *discs lost<sup>A-1</sup>* Scheiben, Patj, ein Marker für die sog. subapikale Region (siehe Einleitung), normal an der apikalen Seite des Epithels exprimiert (Abb. 10 D-F; (Bhat et al., 1999)). Dies untermauert zum einen den Befund, dass es sich bei *discs lost* nicht um eine Mutation in Patj handelt und zum anderen konnte demonstriert werden, dass *discs lost* nicht für die Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität benötigt wird.

Um diese These weiter zu stützen, wurden *discs lost* mutante Zellklone analysiert. Das Follikelepithel des Ovars ist ein einfaches System um Zellpolarität zu untersuchen. Es umgibt einschichtig die sich entwickelnde Oocyte mit ihren 15 Nährzellen und zeigt eine Expression von typischen apikalen Polaritätsmarkern wie z.B. Crumbs, Patj, Armadillo und SAS. Mittels *hsFLP* lassen sich hier mutante Zellklone generieren. Zur Markierung des klonalen Gewebes wurde ein *ubi-GFP FRT80B* Chromosom verwendet, da *arm-lacZ* im Follikelepithel nicht exprimiert wird.



**Abb. 15: Armadillo und Crumbs sind in *discs lost* mutanten Klonen korrekt lokalisiert.** (A-F) Die *dlt<sup>A-1</sup>* Klone im Follikelepithel der Ovarien zeigen keine Fehllokalisierung der apikalen Zellpolaritätsmarker Armadillo (A-C) und Crumbs (D-F). Mutante Zellen sind über die Abwesenheit von GFP (grün; A, D) zu identifizieren.

## Ergebnisse

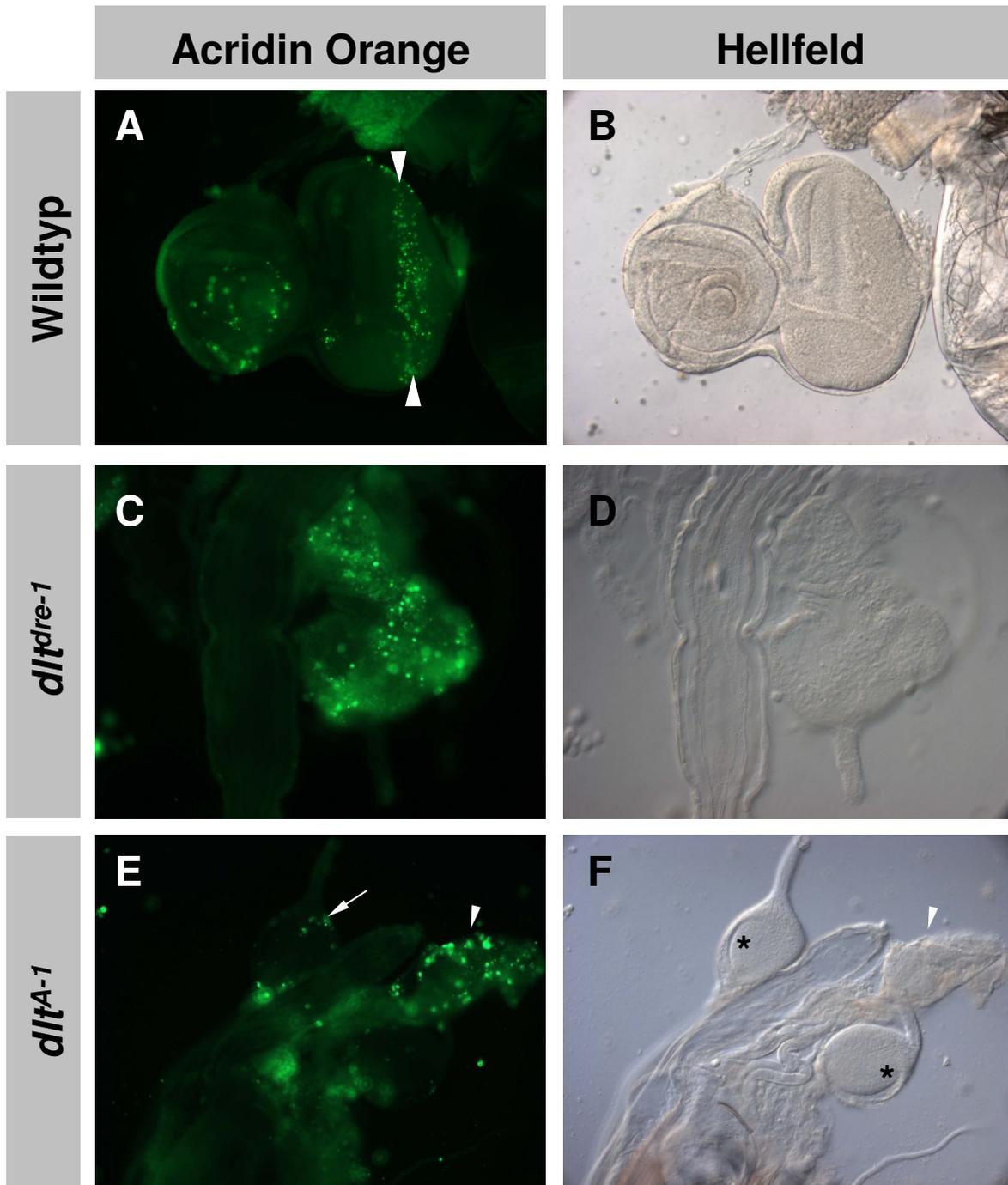
Keiner der untersuchten Marker weist eine Reduktion der Expression oder eine Fehllokalisierung in *discs lost* mutanten Zellen auf. Sowohl Crumbs (Abb. 15 D-F; Subapikale Region) als auch Armadillo (Abb. 15 A-C; Zonula Adherens) sind in *discs lost* Klonen normal verteilt. Das gleiche gilt für die Proteine Patj (subapikale Region) und *Stranded at second* (SAS, apikale Membran) (Daten nicht gezeigt). Es konnte somit für *Discs lost* keine Rolle bei der Etablierung oder Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität nachgewiesen werden.

### 3.1.2.12 *discs lost* führt zu vermehrtem Zelltod

Da die Fähigkeit zur Proliferation zumindest initial in *discs lost* Klonen erhalten bleibt, diese aber adult nicht mehr auftreten (siehe Abschnitt 3.1.2.9), muss es zu vermehrtem Zelltod kommen. Um dies direkt zu testen wurden Acridin Orange Färbungen an Augenantennenimaginalscheiben *discs lost* mutanter L3 Larven durchgeführt. Acridin Orange (AO) ist ein Vitalfarbstoff, der bei Bindung an DNA seine Fluoreszenz um ein Vielfaches verstärkt. In intakten Zellen kann Acridin Orange die Zellmembran nicht passieren und damit nicht an die DNA binden. Bei verletzten, apoptotischen oder nekrotischen Zellen kommt es aber zu einer starken Fluoreszenz, so dass Acridin Orange häufig als Zelltod Marker verwendet wird (Mergliano and Minden, 2003; White et al., 2001; Wolff and Ready, 1993).

In einer Wildtyp Augen-Antennenimaginalscheibe kommt es zu Zelltod in einzelnen Zellen der Antennenscheibe und einer Zone hinter der morphogenetischen Furche (Abb. 16 A und B). Die übrigen Bereiche sind weitgehend frei von Acridin Orange positiven Zellen. In hypomorphen Mutanten wie *discs lost<sup>dre-1</sup>* kommt es zu verstärktem Zelltod in der gesamten Augenantennenimaginalscheibe. Es ist keine distinkte Zelltodzone hinter der morphogenetischen Furche mehr zu erkennen, sondern alle Bereiche, ob nun posterior der Furche mit zum Teil bereits spezifizierten Zellen oder undifferenzierte Zellen anterior der Furche bzw. in der Antennenscheibe sterben in *dre-1* Mutanten in dieser Phase (Abb. 16 C und D). Um welche Zellen es sich genau handelt, ob z.B. die bereits spezifizierten Photorezeptorzellen genauso stark vom Zelltod betroffen sind, wie die noch nicht weiter spezifizierten Zellen, lässt sich mit dieser Methode nicht bestimmen.

*A-1* mutante Augenantennenimaginalscheiben zeigen in der späten L3 Larve bereits eine deutlich stärkere Reduktion der Größe, als dies in *dre-1* Scheiben der Fall ist. Die typische Morphologie der Augenantennenscheibe ist gestört. Der Antennenteil



**Abb. 16: *discs lost* mutante Augen-Antennenimaginalscheiben zeigen vermehrten Zelltod.** (A und B) In wildtypischen L3 Augen-Antennenimaginalscheiben können Acridin Orange (AO) positive Zellen vereinzelt in der Antennenscheibe und vor allem in einer Zone posterior der morphogenetischen Furche detektiert werden (A, Pfeilspitzen). (C und D) In *dlt<sup>dre-1</sup>* Scheiben kommt es zu massivem Zelltod in der gesamten Scheibe (C). (E und F) In *dlt<sup>A-1</sup>* Scheiben hingegen ist bis auf einzelne Zellen (E, Pfeil) kein Zelltod nachzuweisen. Die *dlt<sup>A-1</sup>* Scheiben sind deutlich stärker reduziert als *dlt<sup>dre-1</sup>* Scheiben (F, Sterne), besonders der Antennenteil fehlt fast vollständig. Eventuell sind die verbleibenden Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht auf *discs lost* Funktion angewiesen (siehe Text). Die starke AO Färbung in (E) ist durch abgerissenes Gewebe verursacht (Pfeilspitzen in E und F). In (B, D, F) sind die entsprechenden Hellfeldbilder zu (A, C, E) dargestellt.

## Ergebnisse

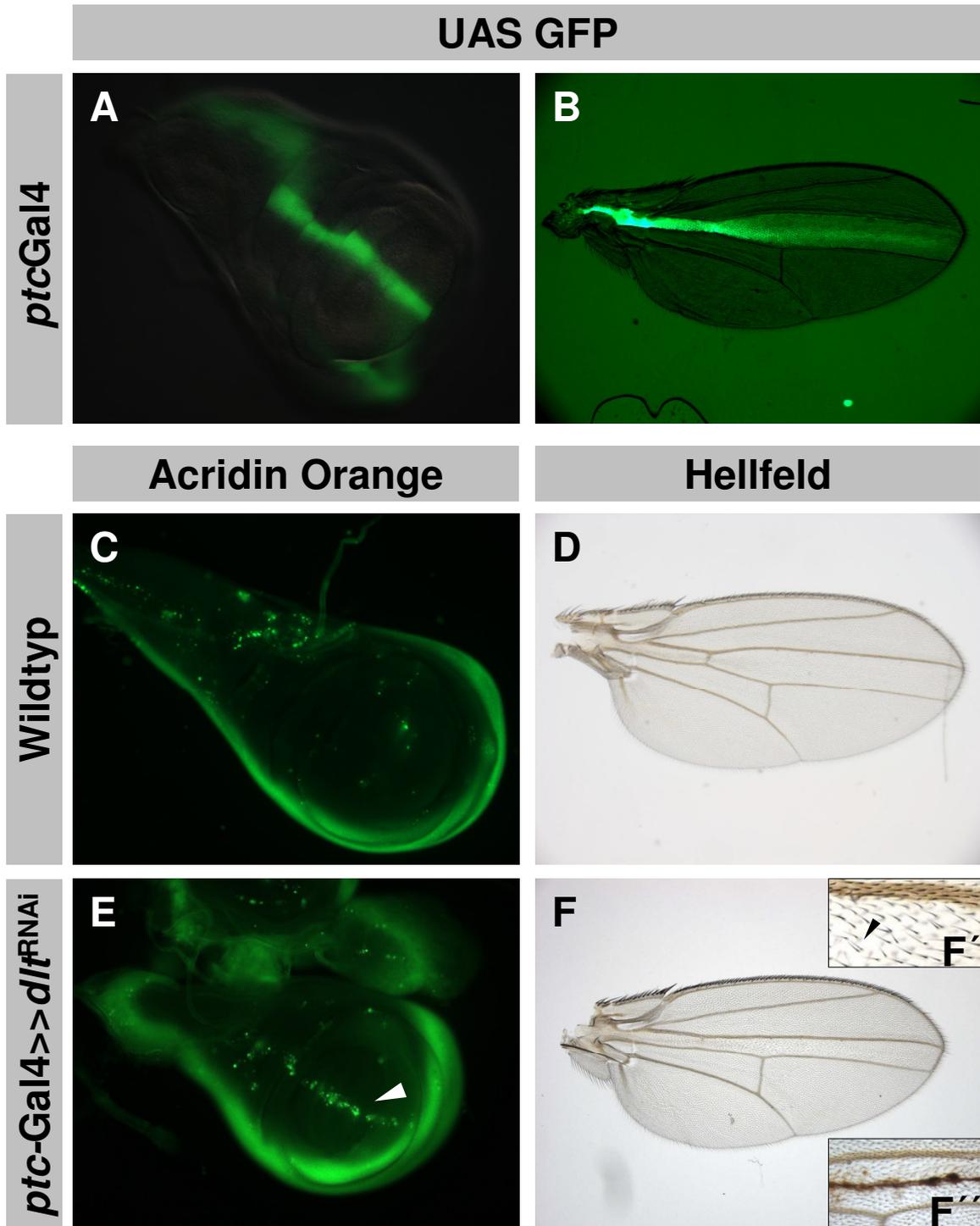
fehlt fast vollständig und der Augenanteil ist zu einer kugel- bis sackartigen Struktur reduziert. In diesen Scheiben ließen sich aber nur vereinzelt Acridin Orange positive Zellen nachweisen, es tritt in diesem Stadium also kaum Zelltod auf (Abb. 16 E und F). In den *A-1* mutanten Tieren scheint die Phase massiven Zelltods wie sie für *dre-1* in der späten L3 Larve auftritt, schon früher abgeschlossen zu sein und die verbleibenden Zellen scheinen zumindest zu diesem Zeitpunkt *Discs lost* nicht für das Überleben zu benötigen. Über die Hemmung von *discs lost* Funktion durch *discs lost* RNAi Expression konnte ebenfalls Zelltod induziert werden (siehe Abschnitt 3.1.2.13).

### **3.1.2.13 *discs lost* RNAi führt zu einer *discs lost* Phänokopie in der Flügelimaginalscheibe**

Der *discs lost* Phänotyp stellte sich in den bisherigen Untersuchungen, vor allem in der klonalen Analyse, als sehr variabel heraus. Dies könnte mit dem lang anhaltenden Einfluss von maternalem *discs lost* Protein oder maternalen mRNA zusammenhängen.

Um zumindest das Problem der maternalen mRNA zu umgehen, wurden *discs lost* UAS RNAi Konstrukte eingesetzt. Es wurde bereits gezeigt, dass *discs lost*-RNAi zu einer spezifischen Reduktion der *Discs lost* Expression führt. Durch entsprechend hohe Expression des RNAi Konstruktes konnte der *discs lost* Phänotyp im Auge phänokopiert werden (Pielage, 2002; Pielage et al., 2003). Dies wurde nun auch in anderen Geweben getestet. So führt die Expression des *discs lost* RNAi Konstruktes in einem Streifen längs über die Flügelscheibe mittels des *patched*-Gal4 (*ptc*-GAL4) Treibers zu einem dosis abhängigen Verlust von Zellen in dieser Domäne (Abb. 17. siehe auch Abb. 18). Die Treiberlinie exprimiert fast in der gesamten Entwicklung der Flügelscheibe in einem Streifen der direkt an der antero-posteriore Kompartimentgrenze liegt (Abb. 17; (Wilder and Perrimon, 1995)).

Durch eine Acridin Orange Färbung wurden die L3 Flügelscheiben in diesem Hintergrund auf vermehrten Zelltod untersucht. In Wildtyp- oder *patched*-Gal4 - Kontrollscheiben zeigt Acridin Orange vereinzelte Cluster von sterbenden Zellen, die über die Flügelscheibe verteilt sind (Abb. 17 C). Bei starker Expression des *discs lost* RNAi Konstruktes (*ptc*-Gal4/3 Kopien UAS *discs lost* RNAi: ***ptc*>>*discs lost*<sup>RNAi</sup>**) kommt es zu einem starken, ektopischen Acridin Orange Signal in der *patched*



**Abb. 17: *discs lost* RNAi führt zu Zelltod in der Flügelimaginalscheibe.**

(A) Der *ptc*-Gal4 Treiber zeigt in der L3 Flügelnscheibe eine Expression in einem Streifen entlang der antero-posterioren Kompartimentgrenze. (B) Diese Expression bleibt bis hin zum Schlüpfen der Fliegen erhalten. Mit Acridin Orange lassen sich in einer wildtypischen L3 Flügelnscheibe vereinzelt sterbende Zellen nachweisen. (E) Durch eine starke Expression von *ptc*GAL4>>UAS *dlt<sup>RNAi</sup>* (3 Kopien) lässt sich in der *ptc*-Domäne Zelltod induzieren (Pfeilspitze). (F) Korrespondierend führt diese Expression zu einem Verlust von Zellen im adulten Flügel in der *ptc*-Domäne. (F) Die RNAi behandelten Zellen sind vergrößert und zeigen zum Teil mehrere Trichome (F', Pfeilspitze). Es kann auch zu erheblichen Nekrosen kommen (F'').

## Ergebnisse

Domäne (Abb. 17 E). *discs lost* RNAi führt also in der L3 Flügelimaginalscheibe zur Induktion von Zelltod.

Diese Reduktion in der Zellzahl spiegelt sich auch im adulten Flügel wider (Abb. 17 F und Abb. 18 D). Hier kommt es zu einer deutlich sichtbaren Verkleinerung des Abstandes der Flügelvenen L3 und L4. Um den Effekt zu quantifizieren, wurde die Zahl der Zellreihen bestimmt, die zwischen den Flügelvenen L3 und L4 liegen.

Im Wildtyp liegen an der 2. Kreuzvene normalerweise 17-18 Zellen zwischen L3 und L4. In den *ptc>>discs lost<sup>RNAi</sup>* Flügeln ist die Zahl auf ca. 10 Zellen reduziert (siehe auch Abb. 18). Außerdem fehlt hier immer die erste Kreuzvene. Die Zellen sind etwas größer als im Wildtyp und es zeigen sich häufig mehrere Trichome (Abb. 17 F') und in besonders starken Fällen traten erhebliche Nekrosen auf (Abb. 17 F'').

Die Expression von nur einer Kopie *UAS discs lost<sup>RNAi</sup>* durch den *ptc-Gal4* Treiber (*ptc>discs lost<sup>RNAi</sup>*), führt zu einer moderaten Abnahme in der Zellzahl von ca. 18 Zellen im Wildtyp auf ca. 16 Zellen.

### 3.1.2.14 *ptc>discs lost<sup>RNAi</sup>* als quantifizierbares Modellsystem

Da sich der *discs lost* Phänotyp in den Mutanten und der klonalen Analyse zum einen als variabel, und zum anderen als schwer zugänglich bzw. schlecht quantifizierbar erwies, wurde versucht den *ptc-Gal4 UAS discs lost<sup>RNAi</sup>* Phänotyp für eine quantitative Studie zu nutzen.

Tatsächlich führt die Expression von *ptc>discs lost<sup>RNAi</sup>* (eine Kopie *UAS discs lost<sup>RNAi</sup>*) zu einer gut zu reproduzierenden Reduktion der Zellzahl um zwei Zellen (siehe Abschnitt 3.1.2.13 und Abb. 18 B und I). Diese Reduktion ist sensitiv für die endogene *discs lost* Dosis. So führt die Herausnahme einer Kopie *discs lost* über das Allel *dre-1* im Hintergrund von *ptc>discs lost<sup>RNAi</sup>* zu einer Verstärkung des Phänotyps und statt 16 Zellen finden sich nur noch ca. 13 Zellen zwischen den Flügelvenen L3 und L4 (Abb. 18 A-C und I). Der RNAi Phänotyp ist also tatsächlich *discs lost* spezifisch zu sein.

Es wurde auch getestet ob die Überexpression von Discs lost im *patched*-Muster eventuell zu einem entgegen gesetzten Phänotyp wie *discs lost<sup>RNAi</sup>* führen könnte. Dies ist allerdings nicht der Fall, die Zellzahl ist im Vergleich zum Treiber alleine nicht verändert (Abb. 18 I). Das *discs lost<sup>RNAi</sup>* System im Flügel konnte nun dazu genutzt werden, die Rolle von *discs lost* weiter zu untersuchen.

### 3.1.2.15 Apoptose und allgemeine Proliferation

Für die Reduktion der Zellzahl, wie sie in *discs lost* Mutanten oder *discs lost*<sup>RNAi</sup> Tieren zu finden ist, können im wesentlichen zwei verschiedene Prozesse eine Rolle spielen. Zum einen könnte die Proliferation der *discs lost* defizienten Zellen gestört sein, weil sie Probleme beim Durchlaufen des Zellzyklus haben und zum anderen wäre es denkbar, dass es zu einer verstärkten Induktion von Apoptose kommt.

Da es in *discs lost* Mutanten zur Induktion von massivem Zelltod kommt, wurde getestet ob sich das Absterben der Zellen durch den generellen Apoptose Inhibitor Baculovirus p35 Protein verhindern ließ. Bei diesem Protein handelt es sich um einen viralen Caspaseinhibitor, der in *Drosophila* in der Lage ist, Apoptose effektiv zu verhindern (Asano et al., 1996; Grewal et al., 2005; Hay et al., 1994; Milan et al., 1997; Neufeld et al., 1998a).

Sollte Discs lost an der Regulation von Apoptose beteiligt sein, so sollten die absterbenden Zellen in *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> durch die Expression des Apoptose Inhibitors gerettet werden. Um dies zu testen wurde UAS p35 gegen die *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> Rekombinante gekreuzt und die Flügel analysiert. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Zellen nicht gerettet werden konnte. Wie bei *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> alleine werden etwa 16 Zellen gebildet. Allerdings fehlte oft die erste Kreuzvene, die L3 Vene erschien teilweise breiter und unorganisierter (Abb. 18 E Pfeil) und es kommt zum Teil zu einer lokalen Ablösung der dorsalen und ventralen Zellschichten des Flügels voneinander.

Ähnliche Effekte, wenn auch in abgeschwächter Form, wurden durch die Koexpression von UAS Myc im *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> Hintergrund erzielt (Daten nicht gezeigt). Bei Myc handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der als ein zentraler Wachstumsregulator fungiert. Myc reguliert diverse Zielgene, die für den allgemeinen Metabolismus und vor allem die rRNA Synthese und Ribosomen Biogenese benötigt werden. In Myc überexprimierenden Zellen kommt es zu einer vermehrten Bildung von Ribosomen, die Zellen werden größer als Wildtypzellen und die Zellen haben ihnen gegenüber einen Proliferationsvorteil (Grewal et al., 2005; Johnston et al., 1999; Moreno and Basler, 2004). Es wurde gezeigt, dass der durch Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren induzierte Verlust von Gewebe im *Drosophila* Auge durch eine Koüberexpression durch Myc revertiert werden kann (Jiao et al., 2001)

## Ergebnisse

Im Zusammenhang mit *discs lost* ist es aber nicht möglich, die Vitalität der Zellen zu retten. Die Zellzahl blieb wie bei der Koexpression von p35 unverändert (Abb. 18 I). Diese Befunde deuten darauf hin, dass *discs lost* Zellen einen generellen Defekt haben, der ihrer Vitalität beeinträchtigt und das Überleben auch bei unterdrückter Apoptose oder durch Steigerung der „allgemeinen Wettbewerbstauglichkeit“ nicht gewährleistet.

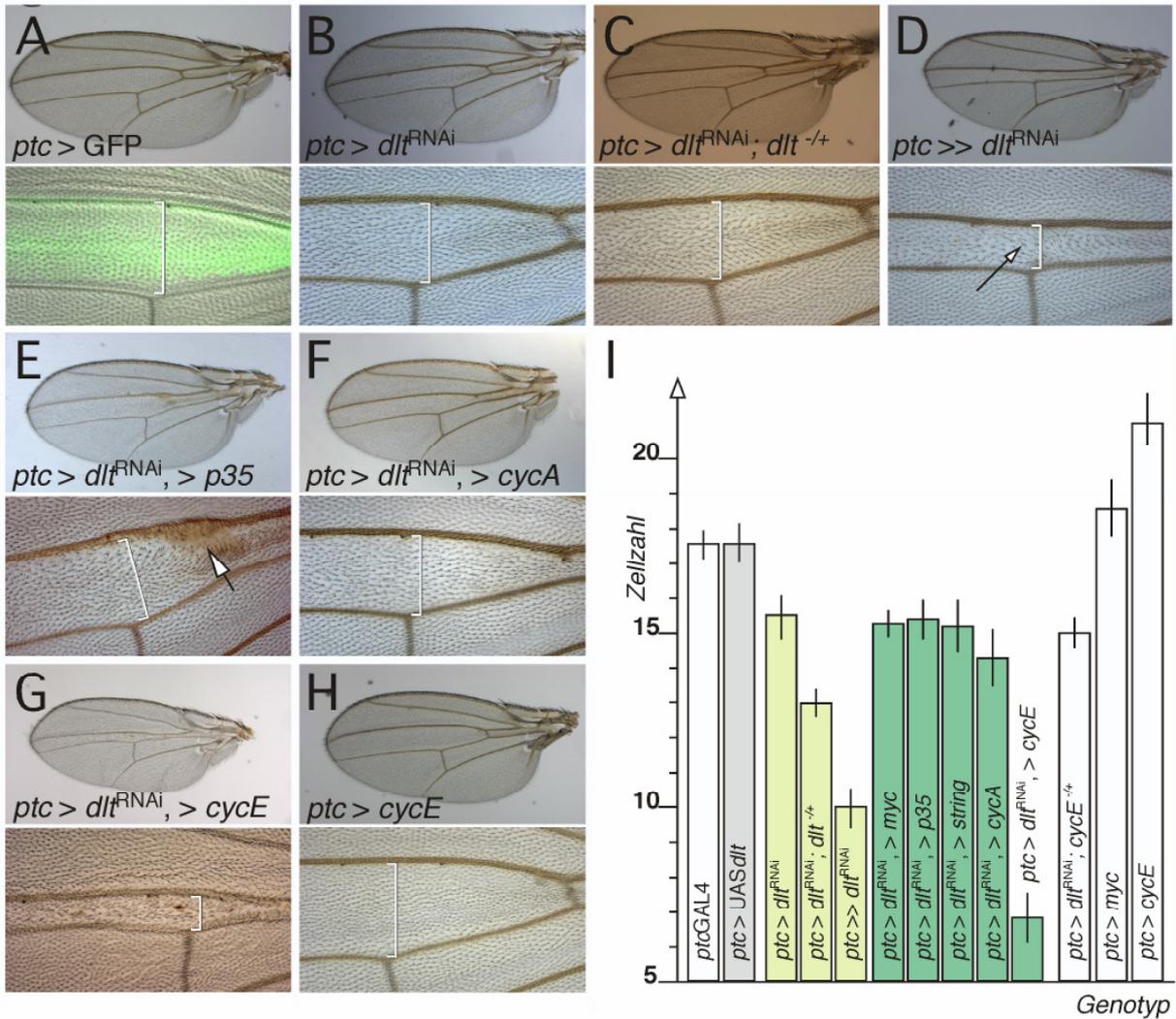
### 3.1.2.16 Zellzyklus

Der *discs lost* Phänotyp könnte auch auf einen Defekt in der Progression des Zellzyklus liegen. Deshalb wurden verschiedene Zellzyklusgene im *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> Hintergrund koexprimiert und auf die Fähigkeit hin untersucht, ob sie den *discs lost* verursachten Zellverlust retten können.

So fördert z.B. die Überexpression von Cyclin E den Eintritt in die S-Phase (Knoblich et al., 1994; Neufeld et al., 1998a). Tatsächlich zeigt die Überexpression von Cyclin E im *patched* Muster eine Erhöhung der Zahl der Zellen, die zwischen L3 und L4 liegen von ca. 18 Zellen im Wildtyp (*ptc-Gal4*) auf ca. 21 Zellen (Abb. 18 H und I). Der Abstand zwischen L3 und L4 scheint dabei wenig beeinflusst, sondern die Zellen sind stattdessen kleiner. Hier gibt es also Mechanismen, die die Organbeziehungsweise Kompartimentgröße unabhängig von der Zellzahl regulieren (Neufeld et al., 1998a).

Die Koexpression von Cyclin E mit *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> zeigte allerdings keine Rettung des RNAi Phänotyps, sondern eine dramatische Verstärkung (Abb. 18 G und I). Es überleben nur ca. 6-7 Zellen, das sind weniger als halb so viele Zellen als in der *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> Situation alleine. Es kommt vereinzelt zu Nekrosen (Abb. 18 G) und die Kreuzvene zwischen L3 und L4 ist nicht vorhanden.

Um zu testen, ob *discs lost* eventuell genetisch mit *cyclin E* interagiert, wurde überprüft, ob der *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> induzierte Phänotyp von der Gendosis von *cyclin E* abhängig ist. Wäre *discs lost* in seiner Funktion unmittelbar von Cyclin E beeinflusst, so sollte die Reduktion von Cyclin E zu einer (partiellen) Rettung des *ptc>discs lost*<sup>RNAi</sup> Phänotyps führen. Die Reduktion auf nur eine Kopie mittels der Nullmutante *cycE*<sup>AR95</sup> zeigte nur eine sehr schwache Verstärkung, so dass es keine Hinweise auf einen unmittelbaren Zusammenhang der des Phänotyps Discs lost Funktion mit Cyclin E gibt.



**Abb. 18: Modulation des *ptc*-Gal4>*discs lost* RNAi Phänotyps im Flügel.** Der Flügel von Fliegen unterschiedlichen Genotyps ist dargestellt. Die unteren Kästen zeigen eine Vergrößerung des Bereich zwischen L3 und L4 Vene an der zweiten Kreuzvene. Die Zellreihen zwischen L3 und L4 wurden gezählt. Die Ergebnisse sind in (I) zusammengefasst. Es wurden jeweils 10 Flügel ausgezählt und der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an.

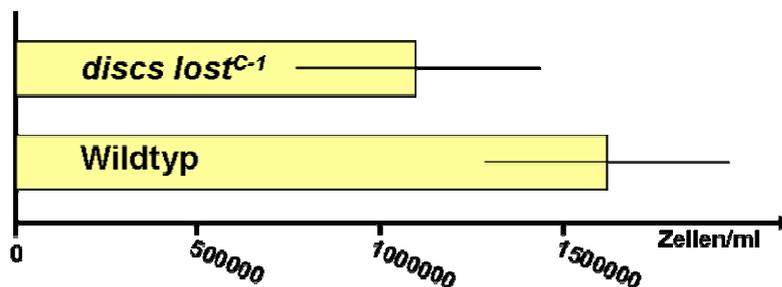
(A) Die grüne Fluoreszenz von UAS GFP zeigt die *ptc*-Gal4 Expressionsdomäne. (B) Moderate *dlt<sup>RNAi</sup>* Behandlung im *ptc*-Muster führt zu einer Reduktion der Zellzahl. Statt 18 Zellreihen (A) liegen nur noch 16 Zellen zwischen L3 und L4. (C) Dieser Effekt ist sensitiv für die endogene *discs lost* Dosis. Im heterozygoten *dlt<sup>dre-1</sup>* Hintergrund wird der Phänotyp verstärkt (C). 3 Kopien UAS *dlt<sup>RNAi</sup>* führen zu einem deutlich stärkeren Verlust von Zellen. Die RNAi Zellen sind größer und tragen mehrere Trichome (D, Pfeil). Die Koexpression von p35 (E) und CycA (F) im RNAi Hintergrund zeigt keine wesentlichen Effekte bezüglich der Zellzahl. In beiden Fällen kommt es zu einer Reduktion, bzw. einem Verlust der ersten Quervene. Koexpression von CycE zeigte eine dramatische Verstärkung des Phänotyps (G). Die Expression von CycE alleine führte zu einem Anstieg in der Zellzahl von ca. 18 auf ca. 21 Zellen. Es wurden noch weitere Genotypen getestet. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in (I) graphisch zusammengefasst.

## Ergebnisse

Es wurden auch Koexpressionen mit den Mitose fördernden Genen *cycA* und *string* durchgeführt (Grosskortenhaas and Sprenger, 2002; Neufeld et al., 1998a). Beide zeigen im Vergleich zur Cyclin E Koexpression nur sehr schwache Effekte. In der CycA Koexpression kommt es oft zu einem Verlust der ersten Quervene.

### 3.1.2.17 *discs lost* Mutanten haben reduzierte Anzahl an Blutzellen

In Codanin-1 Mutanten kommt es zu einer Anämie, da nicht genug Erythrozyten gebildet werden (Abschnitt 3.1.2.1). In *Drosophila* gibt es zwar keine Erythrozyten oder funktionell ähnliche Zellen (Lanot et al., 2001; Lebestky et al., 2000; Tepass et al., 1994), jedoch findet auch hier Hämatopoese statt, um die verschiedenen Blutzelltypen zu bilden. Während der Larvalentwicklung werden in der Lymphdrüse ständig neue Hämocyten gebildet und in die Hämolymphe entlassen (Lanot et al., 2001). Um zu testen ob, *discs lost* Mutanten ebenfalls eine eingeschränkte Hämatopoese zeigen, wurde die Hämolymphe aus *discs lost*<sup>C-1</sup> L3 Larven präpariert (Lanot et al., 2001). Dabei konnte beobachtet werden, dass C-1 Larven um ein Drittel weniger Blutzellen aufweisen als der Wildtyp (Abb. 19).



**Abb. 19: Reduktion der Anzahl der Hämocyten in *discs lost*<sup>C-1</sup> mutanten L3 Larven.** Jeweils 20 Larven wurden ausgewertet. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an.

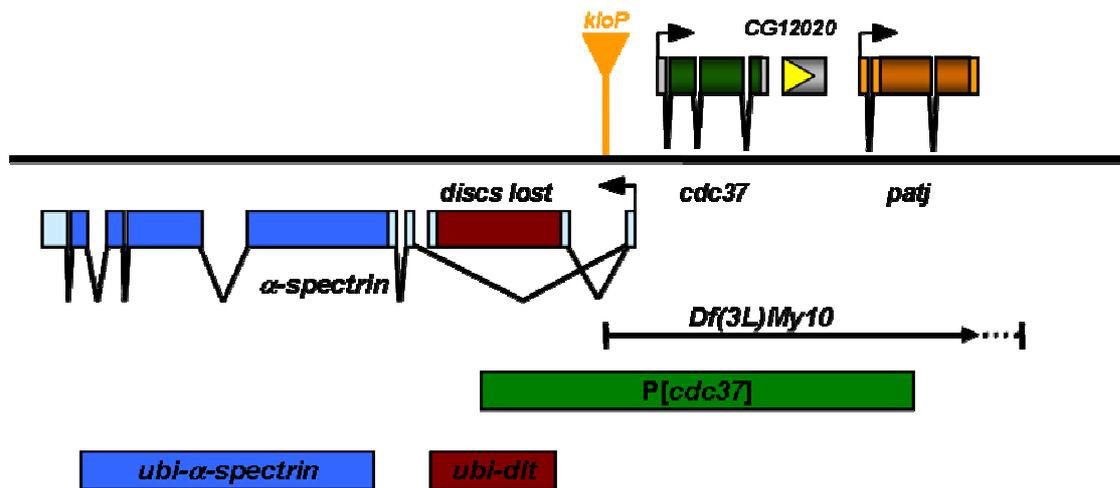
### 3.1.3 Analyse von *patj*

#### 3.1.3.1 Die Funktion von Patj

Wie bereits beschrieben, konnte gezeigt werden, dass der *discs lost* Phänotyp nicht mit Patj zusammenhängt. Die einzig analysierbare Mutante für Patj ist die Defizienz *Df(3L)My10*. Sie ist ausgehend von der Insertion generiert worden und deletiert ca. 10 kb genomische Sequenz (Abb. 1; Abb. 20; (Bhat et al., 1999)). Über die verschiedenen, erhältlichen Rettungskonstrukte in dieser Region sollte nun die Funktion des Patj Proteins untersucht werden. Dazu wurden die beiden Minigene *ubi- $\alpha$ -spectrin* und *ubi-discs lost (CG32315)* und das genomische Fragment *P[cdc37]* in den Hintergrund der Defizienz *My10* gebracht. Die Ausmaße der Konstrukte sind in Abbildung 20 schematisch dargestellt. *P[cdc37]* erstreckt sich über ca. 10 kb und enthält die ORFs für *cdc37* und CG 12020 komplett, aber auch Teile von *discs lost* und *patj* (Cuthfort and Rubin, 1994). Für *discs lost* lässt sich sagen, dass *P[cdc37]* keine Rettung zeigt. Tiere die homozygot *Df(3L)My10* und im Hintergrund die Konstrukte *ubi- $\alpha$ -spectrin* und *P[cdc37]* tragen, zeigen die für *discs lost* typische pupale Letalität mit einer starken Reduktion der Größe der Imaginalscheiben, wie sie vergleichbar auch in *discs lost<sup>A-1</sup>* auftritt (Abb. 11 D-F; vgl. auch Abb. 10 C und Abb. 16 F). *P[cdc37]* hat also keine wesentliche Rettungsaktivität für *discs lost*, obwohl etwa zwei Drittel des *discs lost* ORFs enthalten ist (850 der 1240 Aminosäuren).

Das *P[cdc37]* genomische Fragment enthält auch etwa ein Drittel des Patj ORFs und damit eine von vier PDZ Domänen. Aufgrund der Tatsache, dass das resultierende Patj Protein stark verkürzt wäre und die stabilisierend wirkenden 3' nicht translatierten Bereiche der mRNA fehlen, wurde hier angenommen, dass *P[cdc37]* keine Rettung für *patj* zeigen kann.

Damit kann *patj* nicht embryonale Letalität verursachen, wie bisher vermutet (Bhat et al., 1999). Die Korrektheit der *ubi- $\alpha$ -spectrin*; *P[cdc37]*, *Df(3L)My10* Rettung wurde mit einem anti-Patj Antiserum überprüft, das sich gegen die letzten 14 C-terminalen Aminosäuren richtet (Tanentzapf et al., 2000). Tatsächlich ist das Patj Signal in diesen Augenantennenimaginalscheiben nicht mehr nachweisbar (Abb. 11 E).



**Abb. 20: Rettung der *My10* Defizienz.** Der rechte Bruchpunkt von *Df(3L)My10* ist nicht molekular bekannt. Die Ausdehnung des *P[cdc37]* Fragmentes wurde aus den Angaben von Cutforth und Rubin (1994) abgeleitet.

Da die partielle Rettung typische Merkmale des *discs lost* Phänotyps zeigte, wurde nun versucht, zu den bisherigen Rettungskonstrukten auch noch *ubi-discs lost* in den Hintergrund von *Df(3L)My10* zu bringen. Das verwendete Kreuzungsschema ist in Abbildung 21 dargestellt. Erstaunlicherweise führten diese Rettungskonstrukte zu einer Rettung der *My10* Defizienz zu adulten Fliegen. Aufgrund des initialen Kreuzungsschemas wurden hier erwartungsgemäß nur Weibchen gerettet. Diese zeigten eine normale äußere Morphologie und waren mit Wildtyp- oder *Df(3L)My10/TM6B* Männchen fertil und aus den Eiern schlüpften Larven, die sich zu normalen Fliegen entwickelten. Allerdings legen diese geretteten Weibchen nicht sehr viele Eier und der Anteil an unbefruchteten Eiern war hoch. Ob sich dieser Effekt tatsächlich auf das Fehlen von *patj* zurückführen lässt oder dies mit der unzureichenden Rettung der drei Konstrukte zusammenhängt ist unklar. Die Kreuzung wurde dann so umgestaltet, dass auch gerettete Männchen generiert werden konnten. Diese zeigten wie die Weibchen eine normale äußere Morphologie. Im Gegensatz zu den Weibchen sind die geretteten Männchen aber steril. Auch hier ist unklar, ob dieser Effekt tatsächlich mit *patj* zusammenhängt. Aufgrund der Sterilität der Männchen konnte kein homozygoter *Df(3L)My10* Stamm generiert werden.



### 3.1.4 Analyse von $\alpha$ -spectrin/klötzchen

Die bisherige Analyse des  $\alpha$ -spectrin/discs lost Locus zeigte, dass die beiden Gene genetisch trennbar sind und unterschiedliche Funktionen haben. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass alle Allele der EMS-Mutagenese, die in die  $\alpha$ -spectrin Komplementationsgruppe fallen, tatsächlich Mutationen in  $\alpha$ -spectrin selbst sind. Das intronische Gen *CG32315* kodiert *discs lost* und es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen keinen wesentlichen Einfluss auf die  $\alpha$ -Spectrin Expression hat. Das Gen *CG32315/discs lost* galt vor dieser Analyse als möglicher Kandidat für *klötzchen* (Pielage, 2002). Da die *klötzchen* Mutationen *discs lost* komplementieren und *klötzchen* durch ein  $\alpha$ -spectrin Minigen gerettet werden kann, spricht alles dafür, dass  $\alpha$ -spectrin für *klötzchen* kodiert. Daraufhin wurde die  $\alpha$ -spectrin Komplementationsgruppe genauer untersucht.

#### 3.1.4.1 $\alpha$ -spectrin zeigt intragene Komplementation

Die Analyse der isolierten Chromosomen zeigte, dass insgesamt 21 Allele der  $\alpha$ -spectrin Komplementationsgruppe generiert werden konnten (siehe Tabellen 2 und 3). Alle Allele dieser Gruppe komplementieren weder die Defizienzen *Df(3L)My10* und *Df(3L)Apt32* noch das Nullallel  $\alpha$ -spectrin<sup>g41</sup> und gehören damit eindeutig dieser Komplementationsgruppe an. Die meisten Allele zeigen in trans zu einer Defizienz eine frühe larvale Letalität als L1 Larve, einige Allele aber auch erst als L2 oder frühe L3 Larve (*P-2 und 1.3*).

In der Komplementation der  $\alpha$ -spectrin Allele untereinander (Tabellen 3, 4 und 9) traten auch vitale Kombinationen auf. Die transheterozygoten  $\alpha$ -spectrin mutanten Fliegen zeigten stets eine normale äußere Morphologie, normale Größe und scheinbar ein normales Verhalten. Die Fliegen waren fertil und z.B. für die Kombination *N-2/1.3* konnte ein transheterozygoter Stamm etabliert werden.

Aufgrund der Komplementationsanalyse und der Letalitätsphasen scheint es sich bei den  $\alpha$ -spectrin Allelen  $\alpha$ -spectrin<sup>1.2.1</sup>,  $\alpha$ -spectrin<sup>1.3</sup>,  $\alpha$ -spectrin<sup>N-2</sup>,  $\alpha$ -spectrin<sup>P-2</sup>,  $\alpha$ -spectrin<sup>S-1</sup> und *klötzchen*<sup>N2-141</sup> um besonders schwache Allele zu handeln (Vgl. Tab. 2, 3, 4 und Tab 9).

	1.1	1.2.1	1.2.2	1.3	1.4.1	1.4.2	1.7	2.4.1	2.4.3	2.6.1	2.6.2	2.7.3
<b>E-1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F-1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F-2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>J-1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>N-2</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tab. 9: Komplementationstest verschiedener  $\alpha$ -spectrin Allele.** Ausgewählte Allele der über die Testerchromosomen *P[kloPx]* (linke Spalte, E-1 bis N-2) bzw.  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> (oberste Zeile, 1.1 bis 2.7.3) isolierten  $\alpha$ -spectrin Chromosomen in der Komplementation untereinander. Für die Kombination N-2/1.3 zeigt sich intragene Komplementation.

Es wurde für diese schwachen Allele eine detailliertere Analyse vorgenommen, in der die Allele untereinander komplementiert wurden. Die Kreuzungen wurden bei 17°C und bei 25°C durchgeführt, um eventuell temperatursensitive Effekte aufzudecken. Dabei wurden zum Teil auch die entsprechend reziproken Kreuzungen angesetzt, um eventuelle Maternaleffekte zu detektieren.

Die Auswertung der Kreuzungen zeigte einen schwachen Einfluss der Entwicklungstemperatur auf die Vitalität der transheterozygoten  $\alpha$ -spectrin Tiere (Tab. 10). So führt die Erhöhung der Entwicklungstemperatur auf 25°C in der Kreuzung N-2 X 1.3 zu einer Vitalitätssteigerung. Statt einiger weniger Tiere schlüpften nun mehr als 10% der bei einer vollständigen Komplementation erwarteten Tiere. In der Kombination P-2 X S-1 führt die Temperaturerhöhung dazu, dass nun einige „Escaper“ Tiere auftraten, obwohl dies bei 17°C nicht der Fall war.

Auch konnte ein Maternaleffekt für  $\alpha$ -spectrin gezeigt werden. So zeigt die Kreuzung 1.2.1 X P-2 bei 25°C keine intragene Komplementation, wohingegen die reziproke Kreuzung P-2 X 1.2.1 vital ist (Tab. 10). Da sich in *Drosophila* Eiern eine starke maternale Expression von  $\alpha$ -spectrin mRNA findet (Pielage, 2002) war dieses Ergebnis durchaus zu erwarten.

Die Kreuzungen gaben Hinweise auf ein komplexes Komplementationsverhalten. So ist 1.2.1 in der Kreuzung gegen 1.3 vital, zeigt aber gegen P-2 keine Komplementation (Tab. 10; 25°C). Bei P-2 handelt es sich um das vermeintlich schwächste Allel. Es zeigt bei 25° in der Kreuzung gegen S-1 oder N2-141 Weibchen einige Escaper, wohingegen das Allel 1.3 in diesen Kreuzungen letal ist.

## Ergebnisse

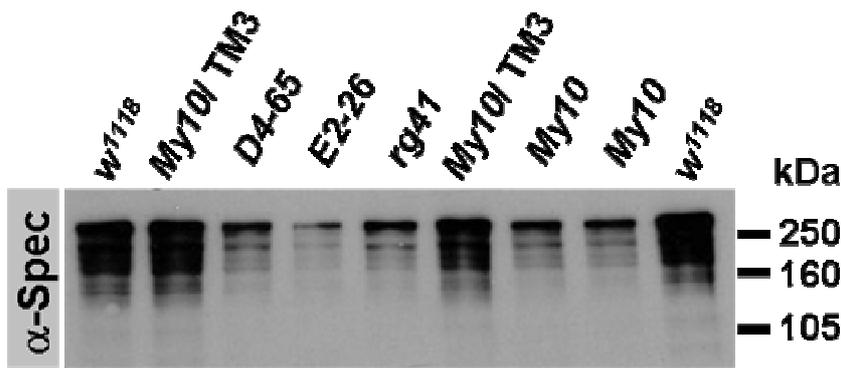
Insgesamt lässt sich sagen, dass hier wahrscheinlich  $\alpha$ -spectrin Mutanten isoliert wurden, die unterschiedliche, funktionell distinkte Domänen des  $\alpha$ -Spectrin Proteins betreffen und es so zu diesem Komplementationsverhalten kommen kann.

17°C						
	1.2.1	1.3	N-2	P-2	S-1	N2-141
1.2.1		+	-	-	-	-
1.3	n.d.		+	+	-	-
N-2	-	Esc.		Esc.	-	-
P-2	Esc.	Esc.	+		-	-
S-1	-	-	-	Esc.		-
N2-141	-	-	-	n.d.	-	
25°C						
	1.2.1	1.3	N-2	P-2	S-1	N2-141
1.2.1		+	-	-	n.d.	-
1.3	+		+	+	n.d.	n.d.
N-2	-	+		Esc.	-	-
P-2	+	+	+		Esc.	Esc.
S-1	-	-	-	Esc.		-
N2-141	-	-	-	Esc.	-	

**Tab. 10: Analyse intragener Komplementation schwacher  $\alpha$ -spectrin Allele.** Komplementationstest verschiedener  $\alpha$ -spec Allele bei 17°C und 25°C. In der linken Spalte ist der Genotyp der Weibchen aufgeführt in der obersten Spalte der Genotyp der Männchen. + bedeutet Komplementation; -: keine Komplementation; Esc.: „Escaper“, es traten einige wenige vitale nicht Balancer-Tiere in einer Kreuzung auf; n.d.: Die Kreuzung wurde nicht durchgeführt/bzw. es sind zu wenig Tiere geschlüpft. Es wurden nur Kreuzungen mit einer vergleichbaren Anzahl Fliegen ausgewertet (>100 Tiere).

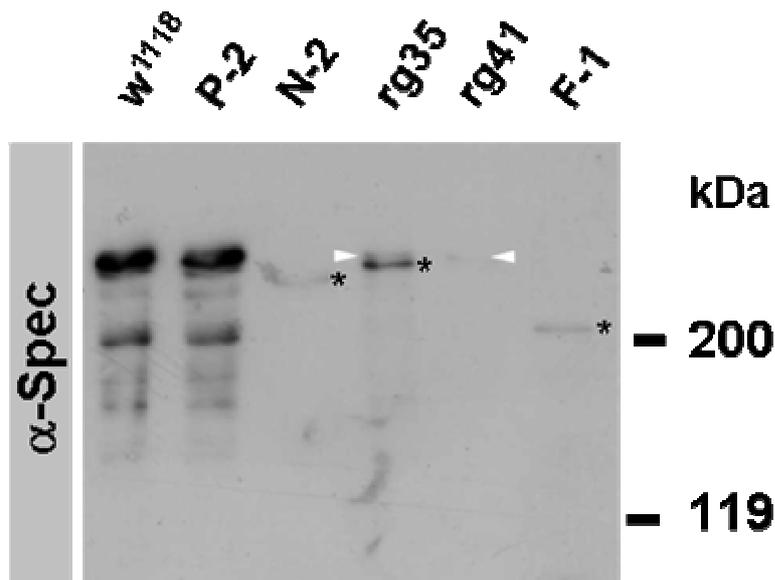
### 3.1.4.2 Molekulare Analyse der $\alpha$ -spectrin/klötzchen Mutanten

Um die verschiedenen  $\alpha$ -spectrin/klötzchen Mutanten besser zu charakterisieren, wurden Lysate mutanter Embryonen in einem Western Blot mit dem anti- $\alpha$ -Spectrin mAb 3A9 analysiert. Dafür wurden verschiedene Mutanten über einen Balancer gebracht, der GFP im *twist* Muster im Embryo exprimiert (TM3 (*twi*/Gal4 UAS EGFP 2X)). Über die Abwesenheit der GFP Fluoreszenz konnten lebende, homozygot mutante Tiere selektioniert und Lysate hergestellt werden. Dabei wurden Embryonen des späten Stadiums 17 analysiert, um die maternale  $\alpha$ -Spectrin Komponente möglichst gering zu halten.



**Abb. 23: Western Blot verschiedener  $\alpha$ -spectrin Mutanten I.** Es wurden Lysate von Embryonen der verschiedenen Genotypen des Stadiums 17 über SDS PAGE (7%) aufgetrennt und die  $\alpha$ -Spectrin Proteinmengen mittels mAb 3A9 im Western Blot analysiert. Es wurden homozygot mutante Embryonen eingesetzt. Als Kontrollen wurden Wildtyp Embryonen ( $w^{1118}$ ) oder heterozygote  $Df(3L)My10/TM3^{twiGFP}$  Embryonen verwendet. Für  $E2-26$  war die aufgetragene Proteinmenge geringer. In anderen Blots war hier die  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge vergleichbar zu  $rg41$  oder  $Df(3L)My10$  (nicht gezeigt).

Im Western Blot zeigen sich für  $\alpha$ -Spectrin, je nach Signalstärke eine Hauptbande bei ca. 280 kDa eine weitere, deutlich schwächere Bande bei ca. 200 kDa und weitere schwache Banden bei denen es sich wohl um Abbauprodukte  $\alpha$ -spectrins handelt (Abb. 23). In der  $\alpha$ -spectrin Nullmutante  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> kommt es zu einer vergleichbaren Reduktion der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge wie in der Defizienz  $Df(3L)My10$ . Es ist aber in der Regel noch ein deutlicher Anteil  $\alpha$ -Spectrin nachzuweisen, der sich wahrscheinlich auf die maternale Expression zurückführen lässt. Auch die beiden klötzchen Allele  $E2-26$  und  $D4-65$  zeigen die gleichen Expressionslevel wie  $Df(3L)My10$  oder  $rg41$ . Es scheint sich ebenfalls um  $\alpha$ -spectrin Nullmutanten zu handeln. Dies ist erstaunlich, da für die verschiedenen Allele unterschiedliche Ausprägungen des fusionierte Kommissuren Phänotyps beschrieben wurden. So wurde gezeigt, dass in der Nullmutante  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> kein oder ein sehr schwacher Phänotyp zu finden ist,  $klo^{E2-26}$ ,  $klo^{D4-65}$  und  $Df(3L)My10$  aber stark fusionierte Kommissuren aufweisen (Hummel et al.; 1999 (Pielage, 2002)). Auffällig ist weiter, dass die  $\alpha$ -Spectrin Proteinlevel offenbar streng reguliert sind. So zeigten heterozygote Tiere, die nur eine intakte  $\alpha$ -spectrin Kopie tragen (Abb. 23;  $Df(3L)My10/TM3^{twiGFP}$ ), vergleichbare Proteinlevel wie Wildtyp Embryonen.



**Abb. 24: Western Blot verschiedener  $\alpha$ -Spectrin Mutanten II.** Es wurden Lysate der verschiedenen Genotypen des Stadiums 17 über SDS PAGE (5%) aufgetrennt und die  $\alpha$ -Spectrin Proteinmengen mittels mAb 3A9 im Western Blot analysiert. Es wurden homozygot mutante Embryonen eingesetzt. Als Kontrollen dienten Wildtyp Embryonen ( $w^{1118}$ ). Die aufgetragenen Proteinmengen sind hier nur bedingt vergleichbar. Für  $rg41$  und  $rg35$  zeigt sich eine schwache Bande maternalen Proteins bei ca. 280 kDa (Pfeilspitzen). Für die  $\alpha$ -spectrin Allele  $N-2$ ,  $rg35$ , und  $F-1$  zeigen sich Banden erhöhter Mobilität (Sterne).  $N-2$ : ca. 253 kDa;  $F-1$ : 214 ca. kDa;  $rg35$ : ca. 266 kDa. Das Allel  $P-2$  zeigt weder eine Reduktion des Proteinlevels noch verkürzte Produkte.

Es wurden auch die in dieser Arbeit isolierten  $\alpha$ -spectrin Allele  $P-2$ ,  $N-2$  und  $F-1$  im Western Blot auf  $\alpha$ -Spectrin Expression analysiert (Abb. 24). Dabei zeigte sich, dass in homozygoten  $N-2$  und  $F-1$  Embryonen verkürzte Produkte gebildet werden. Diese verkürzten Proteine laufen bei ca. 253 kDa für  $N-2$  und ca. 214 kDa für  $F-1$ . Für  $\alpha$ -spec<sup>rg35</sup> konnte die bereits publizierte C-terminale Verkürzung des Proteins um 90 Aminosäuren (minus 10 kDa) reproduziert werden (Lee et al., 1993).

In  $\alpha$ -spec<sup>P-2</sup> Mutanten konnte keine Veränderung der Proteinmenge oder des Musters der Proteinbanden im Vergleich zu Wildtyp Embryonen festgestellt werden. Bei  $P-2$  scheint es sich also um eine Punktmutation in  $\alpha$ -Spectrin zu handeln. Bei  $F-1$  und  $N-2$  handelt es sich wahrscheinlich um vorzeitige Stoppmutationen, die zu einer entsprechenden Verkürzung führen. Alternativ könnte es sich auch um Punktmutationen handeln, welche die Stabilität  $\alpha$ -Spectrins beeinträchtigen und so zu den entsprechenden Abbauprodukten führen.

### 3.1.4.3 Sequenzanalyse verschiedener $\alpha$ -spectrin Mutanten

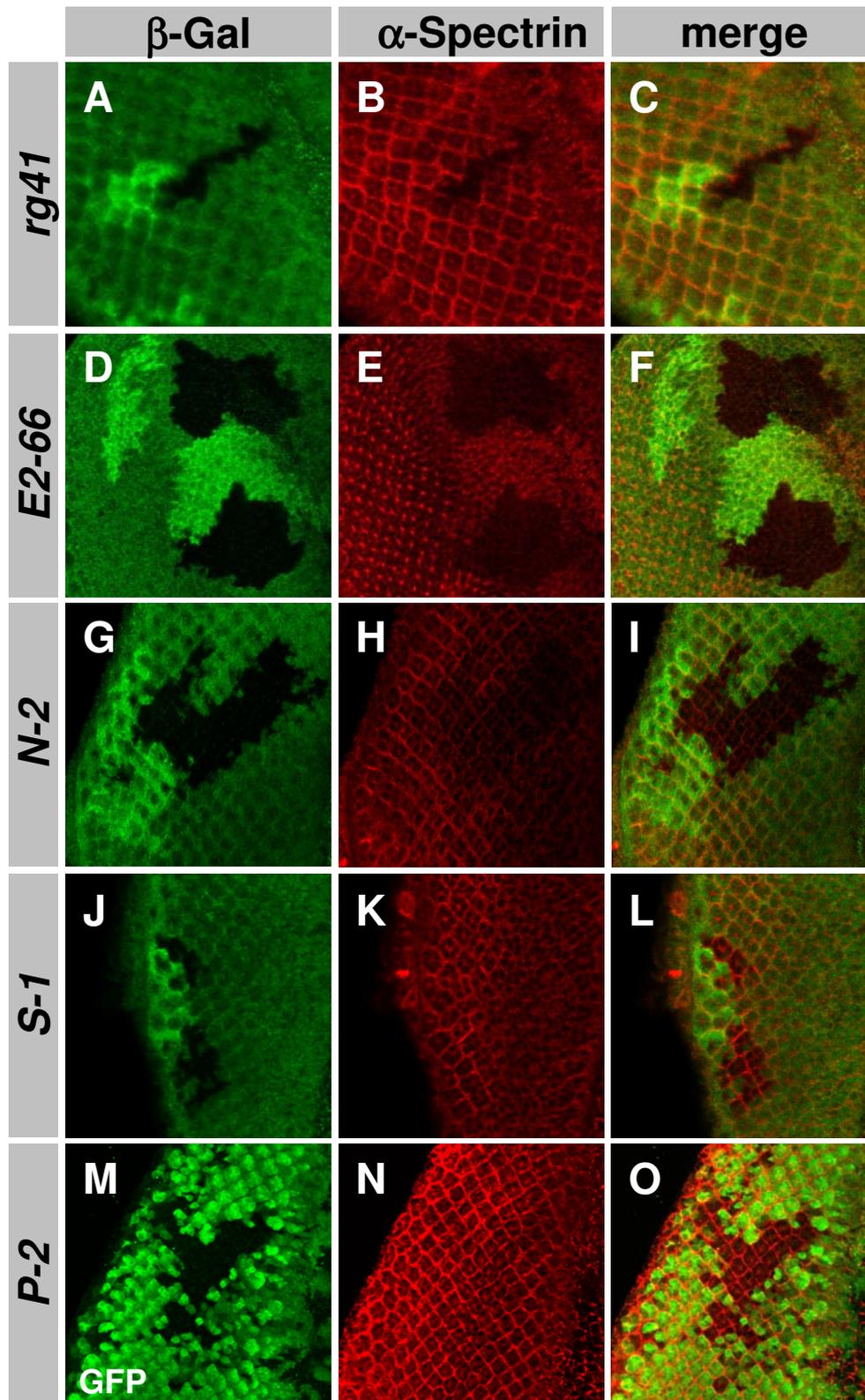
Um die *klötzchen*/ $\alpha$ -spectrin Mutationen besser zu charakterisieren, wurden Sequenzanalysen im  $\alpha$ -Spectrin ORF vorgenommen. Da  $\alpha$ -Spectrin durch eine cDNA von fast 8kb Länge kodiert wird, wurde die Analyse bisher auf die N-terminale Hälfte konzentriert. Es wurden die  $\alpha$ -spectrin/*klötzchen* Mutanten *E2-26*, *D4-65*, *N2-141*, *1.7 F-2* und *E-1* analysiert. Dazu wurde das zweite und dritte  $\alpha$ -spectrin Exon (vgl. Abb. 1) in zwei Amplicons von jeweils ca. 2,2 kb aus heterozygoter, genomischer DNA per PCR amplifiziert und die Fragmente über weitere Primer direkt sequenziert.

In diesem Bereich konnte nur für *klötzchen*<sup>*E2-26*</sup> eine Mutation gefunden werden. Es handelte sich um eine Mutation eines Adenins in ein Thymin, so dass das Codon für Aminosäure 84 von AAA in das Stoppcodon TAA geändert wurde. Es handelt sich bei dem „*klötzchen*“-Allel *E2-26* um ein Nullallel von  $\alpha$ -spectrin, da es das normalerweise 2416 Aminosäuren umfassende  $\alpha$ -Spectrin Protein noch stärker verkürzt, als die publizierte Nullmutante *rg41*. In dieser führt eine Deletion von 20 Basenpaaren zu einer Leserasterverschiebung bei Aminosäure 91, und einem Stopp nach weiteren 40 Aminosäuren.

### 3.1.4.4 Die klonale Analyse der $\alpha$ -spectrin Mutanten

Um die Expression und die subzelluläre Lokalisation der mutanten  $\alpha$ -Spectrin Proteine *in vivo* zu untersuchen, wurde eine klonale Analyse vorgenommen. Dazu wurden von verschiedenen  $\alpha$ -spectrin Mutanten durch Rekombination FRT80B Chromosomen generiert und mutante Klone entweder mit *hsFLP* oder *eyFLP* induziert. Die Klone wurden in der L3 Augenimaginalscheiben untersucht, wobei sich zum Teil das mutante Gewebe anhand der Abwesenheit zellulärer Marker (*arm-lacZ* oder *ubi-GFP*) identifizieren ließ (Abb. 25). In anderen Fällen waren die Klone nicht markiert. Allerdings konnten mittels der *eyFLP/Minute* Technik Augen-Antennenimaginalscheiben generiert werden, in denen fast alle Zellen des Epithels mutant waren (Abb. 26).

Abbildung 25 zeigt markierte Klone verschiedener  $\alpha$ -spectrin Allele. Für das Nullallel  $\alpha$ -spec<sup>*rg41*</sup> zeigte das mutante Gewebe erwartungsgemäß eine so starke Abnahme des  $\alpha$ -Spectrin Proteins, dass es sich immunhistologisch nicht mehr nachweisen ließ



**Abb. 25: Untersuchung der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge in mutanten Zellklonen.** Die  $\alpha$ -spectrin Klone wurden mittels *hsFLP* (A-L) oder *eyFLP* (M-O) generiert und das mutante Gewebe anhand der Abwesenheit eines Zellmarkers (grün, A-L:  $\beta$ -Gal, M-O: GFP) in der L3 Augen-Antennenimaginalscheibe identifiziert. (A-C) In  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> Klonen ist  $\alpha$ -Spectrin nicht mehr zu detektieren. (D-I) In den Allelen *klo*<sup>E2-66</sup> und  $\alpha$ -spectrin<sup>N-2</sup> ist die Proteinmenge reduziert, und (J-O) in Klonen von  $\alpha$ -spectrin<sup>S-1</sup> und  $\alpha$ -spectrin<sup>P-2</sup> zeigt sich keine Beeinträchtigung der Expressionsstärke. Fehllokalisiertes  $\alpha$ -Spectrin Protein konnte in keinem Fall identifiziert werden.

## Ergebnisse

(Abb. 25 A-C). Offensichtlich reichen  $\alpha$ -spectrin Protein und mRNA der heterozygoten Klonausgangszelle nicht aus, um selbst in kleinen Klonen  $\alpha$ -spectrin Expression aufrechtzuerhalten. Wie dies bereits im Western Blot gezeigt wurde, ist die  $\alpha$ -Spectrin Expression streng reguliert. So zeigten die homozygot wildtypischen Zwillingsklone (verstärkte  $\beta$ -Galaktosidase Expression in Abb. 25; A, D, G, J) immer eine vergleichbare  $\alpha$ -Spectrin Protein Expression wie das umgebende heterozygote Gewebe.

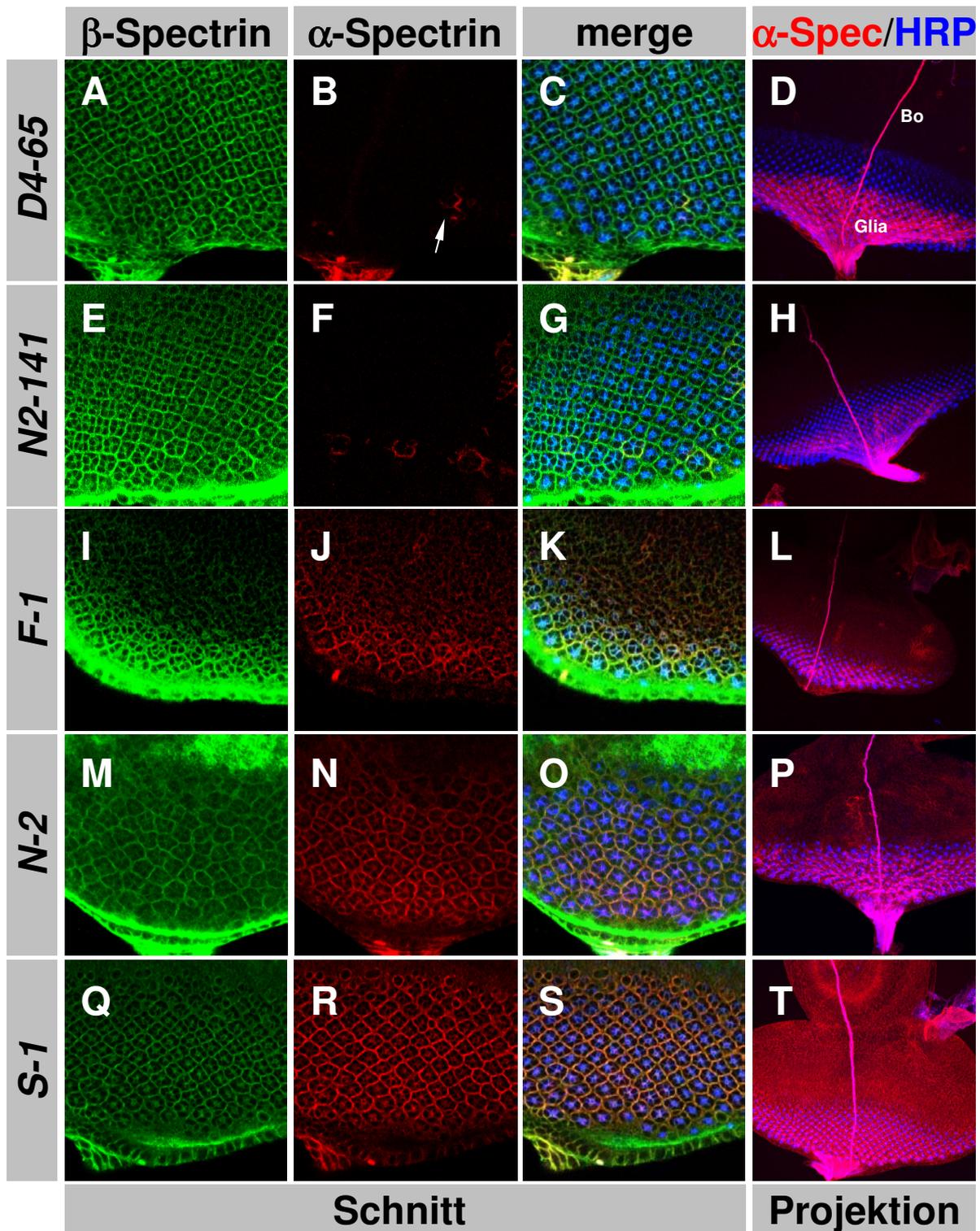
Auch in den Klonen von *D4-65* und *N2-141* kommt es zu einem völligen Verlust des  $\alpha$ -Spectrin Proteins auf immunhistologischer Ebene (Abb. 26). In diesen, mit der *eyFLP Minute* Technik generierten Klonen, waren fast alle Zellen des Epithels und der Peripodialmembran mutant. Neben einzelnen heterozygoten Zellen in der eigentlichen Scheibe waren auch immer Gliazellen und die Axone des Bolwignervs  $\alpha$ -Spectrin positiv. Dies hängt damit zusammen, dass *eyFLP* in diesen Zellen nicht exprimiert wird und deshalb keine Klone induziert werden können. Die  $\alpha$ -Spectrin Expression in diesen Zellen konnte als interne Kontrolle verwendet werden.

In den mutanten Klonen von *F-1*, *N-2* und *E2-66* kommt es zu einer Abnahme der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge, wobei *E2-66* die stärkste (Abb. 25 D-F) und *N-2* die schwächste Reduktion der Expression aufweist (Abb. 25 G-I; Abb. 26 M-P). Es zeigte sich allerdings in keinem der Allele eine Fehllokalisierung. Das  $\alpha$ -Spectrin Protein war immer korrekt an der Membran lokalisiert.

Die homozygot mutanten Klone der Allele  $\alpha$ -spec<sup>P-2</sup> und  $\alpha$ -spec<sup>S-1</sup> führen nicht zu einer Abnahme der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge. Auch hier ist keine Fehllokalisierung des Proteins zu beobachten.

In  $\alpha$ -spectrin<sup>N-2</sup> mutanten Augenscheiben kommt es zu einer Fehlorganisation der Photorezeptoren (Abb. 26 O und P). Die normale hexagonale Anordnung der Cluster war desorganisiert, zum Teil waren die Augen-Antennenimaginalscheiben insgesamt leicht deformiert. Diese Effekte sind wahrscheinlich auf Hintergrundmutationen zurückzuführen, da die anderen, analysierten Allele diesen Effekt nicht zeigten (vgl. Abb. 25 und 26).

In Klonen der  $\alpha$ -spectrin/klötzchen Allele *D4-65*, *N2-141*, *F-1*, *N-2* und *S-1* wurde mittels eines polyklonalen Antiserums die Expression von  $\beta$ -Spectrin überprüft (Hülsmeier, 2005). In allen analysierten Allelen zeigte  $\beta$ -Spectrin eine normale Expressionsstärke und wurde wie im Wildtyp normal an die Zellmembran rekrutiert



**Abb. 26: Untersuchung der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge in mutanten Zellklonen II.** Die  $\alpha$ -spectrin Klonen wurden mittels der eyFLP Minute Technik generiert. Das Epithel der Augen-Antennenimaginalscheibe ist bis auf einige Zellen (z.B. Pfeil in B) mutant für  $\alpha$ -spectrin. Die einwandernden Gliazellen (Glia, D) und der Bolwignerv sind nie mutant (Bo, D). In der rechten Spalte sind Projektionen aller Ebenen dargestellt, in den linken Spalten einzelne konfokale Schnittebenen. In  $klo^{D4-65}$  und  $klo^{N2-141}$  Klonen kommt es zu einem völligen Verlust von  $\alpha$ -Spectrin. (A-H) In  $\alpha$ -spec<sup>F-1</sup> und  $\alpha$ -spec<sup>N-2</sup> Klonen ist die  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge reduziert und in (Q-T)  $\alpha$ -spec<sup>S-1</sup> zeigt sich keine Änderung. In  $\alpha$ -spec<sup>N-2</sup> Klonen ist die Differenzierung der Neurone gestört (blau, HRP).

## Ergebnisse

(Abb. 26). Dies zeigt, dass  $\beta$ -Spectrin unabhängig von  $\alpha$ -Spectrin lokalisiert (Dubreuil et al., 2000; Hülsmeier, 2005; Lee et al., 1997).

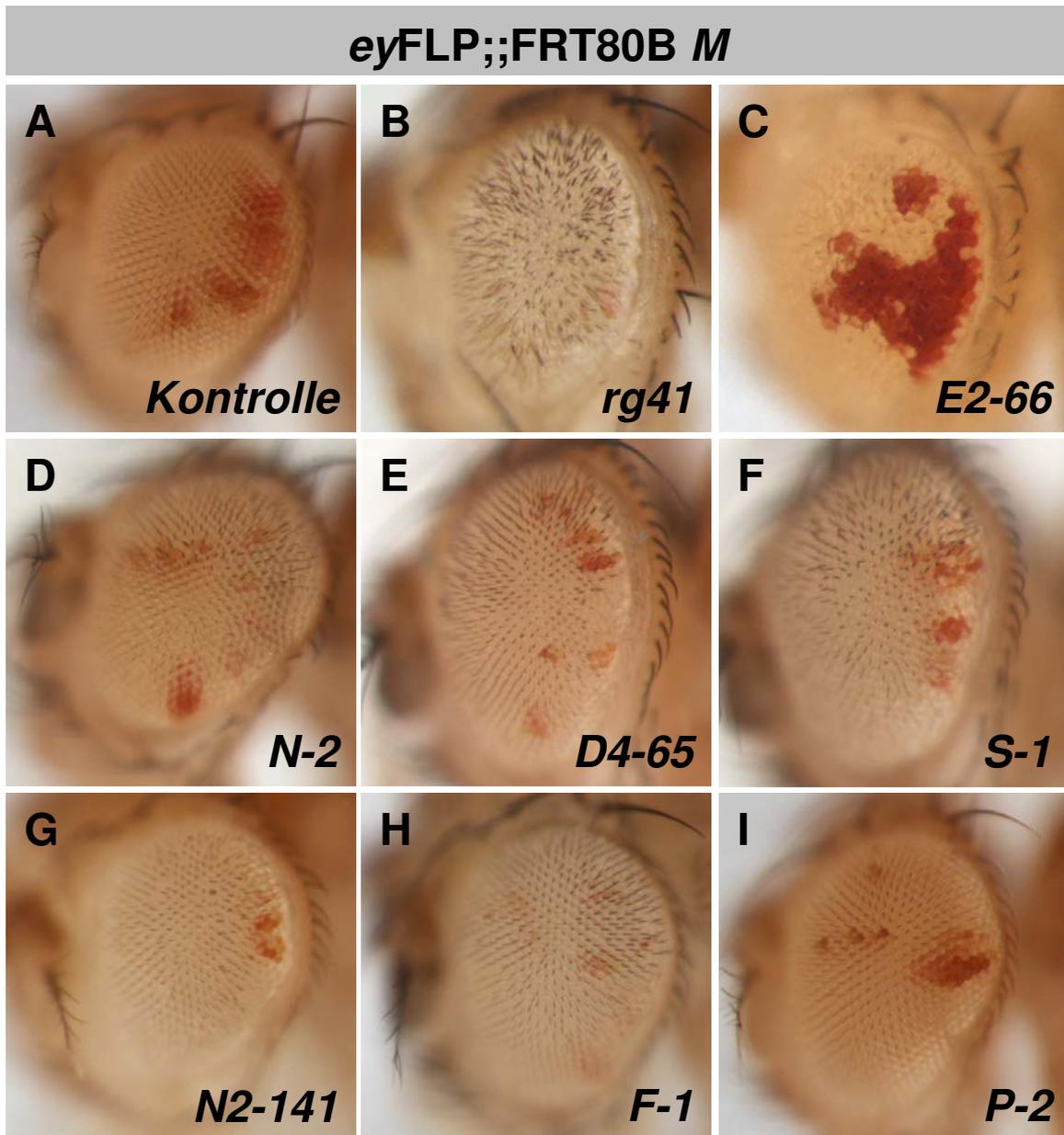
### 3.1.4.5 Analyse adulter Phänotypen von $\alpha$ -spectrin

Um eine mögliche Funktion von  $\alpha$ -Spectrin in der Entwicklung des Auges zu untersuchen, wurden Klone mittels der *eyFLP/Minute* Technik generiert und die adulten Augen analysiert (Abb. 27). Die weißen Ommatidien zeigen die homozygot mutanten Bereiche, während die rot gefärbten Ommatidien heterozygote und damit wildtypische Bereiche markieren.

Das Nullallel  $\alpha$ -spectrin<sup>g41</sup> trägt auf dem linken Arm des Chromosoms noch die Mutation *roughoid* (*ru*), die zu rauhen Augen führt. Diese Mutation konnte bei der Generierung des  $\alpha$ -spectrin<sup>g41</sup> FRT Chromosoms aufgrund der engen genomischen Nachbarschaft der beiden Gene nicht entfernt werden. Dementsprechend sind  $\alpha$ -spectrin<sup>g41</sup> mutante Augen deutlich rau. Der Einfluss der  $\alpha$ -spectrin Mutante auf diesen Phänotyp ist jedoch ungewiss. Deshalb wurden weitere Allele analysiert. Auch die  $\alpha$ -spectrin Allele *D4-65*, *N2-141*, *F-1*, *N-2* und *S-1* führen in homozygoten Klonen zu leicht rauhen Augen, wobei der Phänotyp qualitativ ähnlich ist. Die hexagonale Anordnung der Ommatidien ist teilweise leicht aufgelöst und die interommatidialen Borsten stehen oft nicht orthogonal zur Augenoberfläche. Das Allel *F-1* zeigte eine vergleichsweise schwache Ausprägung dieses Phänotyps und für das Allel *P-2* wurde ein absolut wildtypisches Aussehen des Auges beobachtet.

Klone des  $\alpha$ -spectrin Allels *E2-66* zeigen im Vergleich zu *D4-65*, *N2-141*, *F-1*, *N-2* und *S-1* einen deutlich stärkeren Phänotyp. Die Augen sind leicht verkleinert, die interommatidialen Borsten fehlen in einigen Bereichen und die heterozygoten Bereiche sind in der Regel vergrößert. Außerdem hat das Auge ein leicht glasiges Aussehen. Die übrigen analysierten Allele zeigen diese Merkmale nicht, so dass von Hintergrundmutationen auf dem linken Chromosomenarm des FRT  $\alpha$ -spectrin<sup>E2-66</sup> Chromosoms ausgegangen werden muss.

Auch das FRT  $\alpha$ -spectrin<sup>N-2</sup> Chromosom trägt eine zusätzliche Mutation, die sich variabel ausprägt. Neben den, in Abbildung 27 D abgebildeten, milden Phänotypen konnten auch leicht verkleinerte und vor allem deformierte Augen gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Defekt spiegelte sich auch der Analyse der L3 Augen-Antennenimaginalscheiben wieder (Abb. 26 N). Viele Augen-Antennenimaginalscheiben waren bereits zu diesem Zeitpunkt verkleinert und



**Abb. 27:  $\alpha$ -spectrin Augenkclone führen zu rauhen Augen.** Die Induktion von  $\alpha$ -spectrin Klonen im Auge über eyFLP, FRT M führt zu einer variablen Reduktion der Augengröße. Die mutanten Ommatidien sind weiß, während die heterozygoten Bereiche rot markiert sind. (A) zeigt eine Kontrolle mit einem nicht mutanten FRT Chromosom. (B) Das  $\alpha$ -spec<sup>rg41</sup> Chromosom trägt eine roughoid Mutation im Hintergrund, die zu deutlich rauhen Augen führt. (C)  $klo^{E2-66}$  zeigt einen  $\alpha$ -spectrin untypischen Augenphänotyp, der wahrscheinlich auf eine Hintergrundmutation zurückzuführen ist. (I)  $\alpha$ -spec<sup>P-2</sup> mutante Augen zeigen ein wildtypisches Muster im Auge. (D-H) Die übrigen  $\alpha$ -spectrin Mutanten haben leicht rauhe Augen, in denen vor allem die interommatidialen Borsten fehlorientiert und zum Teil auch fehllokalisiert sind.

## Ergebnisse

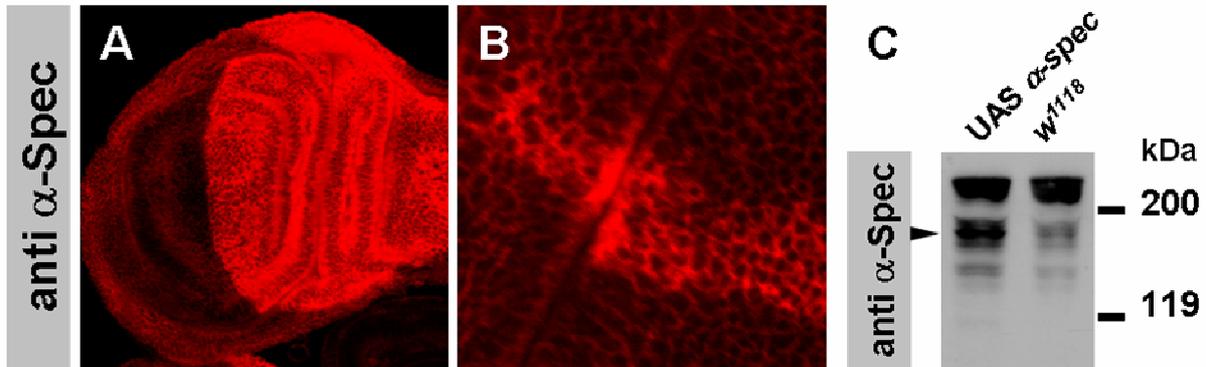
deformiert. Auch die Photorezeptorzellcluster zeigten nicht die typische hexagonale Anordnung, sondern die Cluster waren zufällig orientiert. Dieser Phänotyp konnte in den übrigen *α-spectrin* Allelen nicht beobachtet werden, so dass wahrscheinlich eine Hintergrundmutation für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

### 3.1.4.6 Generierung eines UAS $\alpha$ -Spectrin Konstruktes

Um die Rolle  $\alpha$ -Spectrins detaillierter untersuchen zu können, wurde versucht, ein UAS *α-spectrin* Konstrukt zu generieren. Damit wäre über verschiedene GAL4 Treiber eine Analyse eventueller Folgen einer Überexpression  $\alpha$ -Spectrins und gewebsspezifische Rettungsexperimente möglich gewesen. Dazu wurden entsprechende cDNAs durch Restriktionsanalyse auf ihre Vollständigkeit hin überprüft. Der cDNA Klon RE03775 erwies sich nach ausgiebiger Restriktionsanalyse als möglicherweise vollständig und wurde in den pUAST Vektor kloniert. Da die cDNA fast 8 kb umfasst, wurde von einer Sequenzierung des Bereichs abgesehen. Es wurden Fliegen transformiert und das UAS Konstrukt mittels diverser Treiber in unterschiedlichen Geweben überexprimiert (*da-Gal4*, *ptc-Gal4*, *en-Gal4*, *ap-Gal4*, *ey-Gal4*, *loco-Gal4*, *slit-Gal4*, *elav-Gal4*). In keiner der Kreuzungen kam es zu einer abnormen Entwicklung. Alle getesteten Expressionen waren vital und die Fliegen zeigten absolut wildtypisches Aussehen (Daten nicht gezeigt). Einige Überexpressionen wurden immunhistologisch untersucht. So zeigten Überexpressionen mit *apterous-Gal4* oder *patched-GAL4* ein verstärktes  $\alpha$ -Spectrin Signal in den entsprechenden Expressionsdomänen der Treiberlinien in der Flügelimaginalscheibe (Abb. 28 A und B). Allerdings erschien die Lokalisation des überexprimierten  $\alpha$ -Spectrin Proteins zumindest zum Teil auch cytoplasmatisch (Abb. 28 A und B). Ob dieses Verhalten auf den starken Überschuss an  $\alpha$ -Spectrin Protein in der Überexpressionssituation oder eventuell auf eine Mutation in der cDNA zurückzuführen war, wurde im Folgenden getestet. So wurde versucht verschiedene *α-spectrin* mutante Kombinationen durch eine ubiquitäre Expression von UAS *α-spectrin* mittels des *da-Gal4* Treibers zu retten. Da dies für starke Allele nicht gelang, wurde versucht die schwächsten Allele in trans zum Nullallel *α-spectrin<sup>rg41</sup>* zu retten. Dies gelang jedoch weder für die *α-spectrin* Allele *N-2*, *P-2* noch für *1-3*. Zwar kann es sein, dass die Expressionsstärke und das Muster der Expression über das UAS/GAL4 System nicht absolut der wildtypischen Expression entsprachen, jedoch

## Ergebnisse

wurde doch zumindest für die schwachen Allele eine (partielle) Rettung erwartet. Da diese nicht eintrat, ist das UAS- $\alpha$ -spectrin Konstrukt scheinbar nicht funktionell.



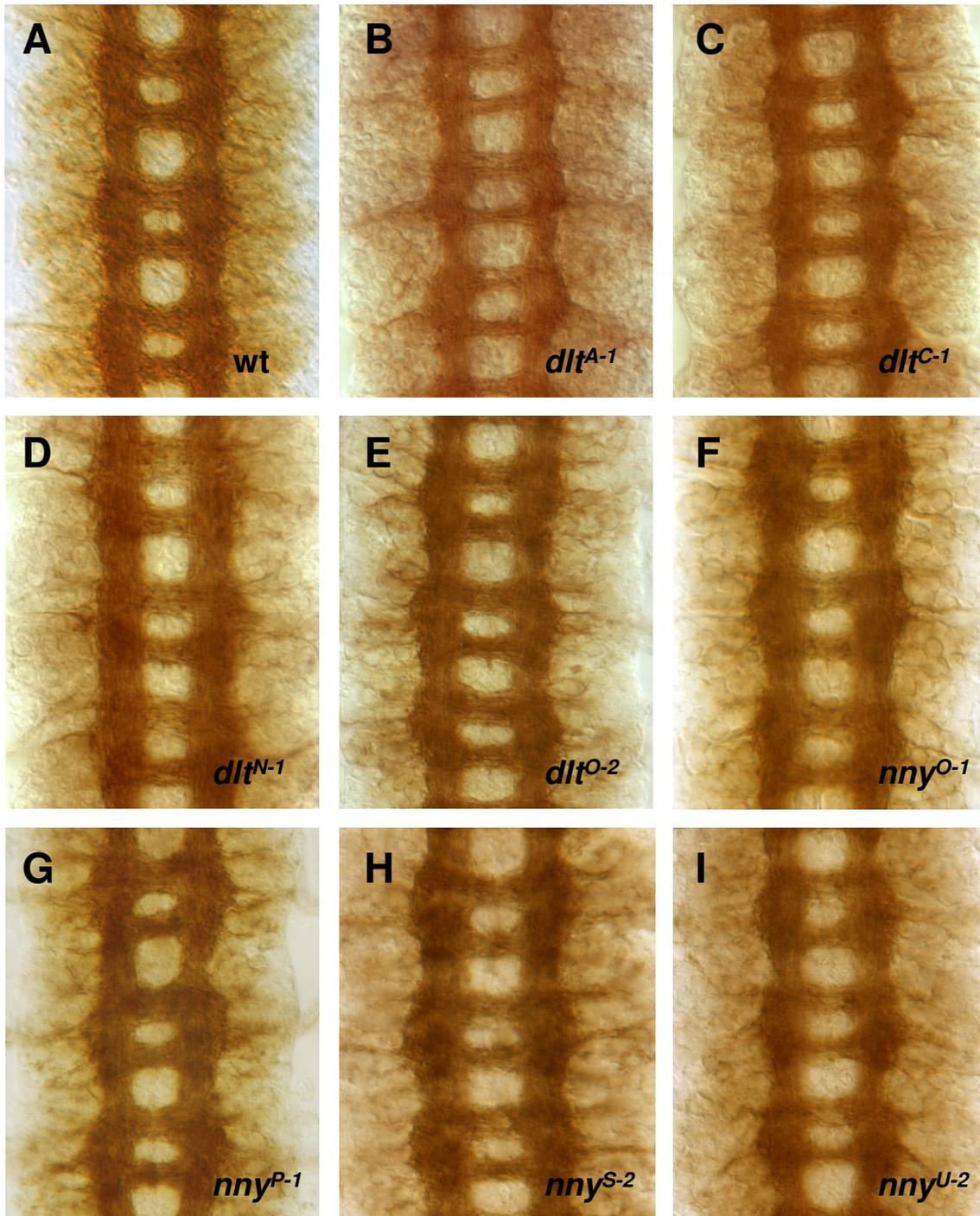
**Abb. 28: Überexpression der  $\alpha$ -spectrin cDNA.** Die Expression des UAS  $\alpha$ -spectrin Konstruktes in der Flügelscheibe mittels *ap*-Gal4 (A) oder *ptc*-Gal4 (B) führt zu einem verstärkten  $\alpha$ -Spectrin Signal in den entsprechenden Expressionsdomänen. Das Protein scheint nicht wie das endogene  $\alpha$ -Spectrin effektiv zur Zellmembran rekrutiert zu werden, sondern es findet sich auch cytoplasmatische Expression (A und B). In (C) ist eine Western Blot Analyse von *Drosophila* Kopflysaten gezeigt. Die Überexpression der  $\alpha$ -spectrin cDNA mittels *daughterless*-Gal4 zeigt eine prominente, zusätzliche  $\alpha$ -Spectrin positive Bande bei ca. 180 kDa. Die cDNA trägt scheinbar eine Mutation, die zu der Expression dieses verkürzten, nicht funktionellen Proteins führt (siehe Text).

Es wurde in einer Western Blot Analyse überprüft, ob sich mit Hilfe des UAS Konstruktes ein vollständiges  $\alpha$ -Spectrin Protein exprimieren lässt. Es zeigte sich in der Überexpression im Vergleich zum Wildtyp eine zusätzliche, stark ausgeprägte Bande bei ca. 180 kDa (Abb. 28; C, Pfeilspitze). Diese Bande trat in  $\alpha$ -Spectrin Überexpressionen mittels des *ubi*- $\alpha$ -spectrin Konstruktes nicht auf (Daten nicht gezeigt), so dass sie wahrscheinlich nicht durch Degradation überschüssigen  $\alpha$ -Spectrin Proteins entstanden ist. Es könnte in der RE03775 cDNA also wahrscheinlich entweder durch ein verfrühtes Stoppcodon oder durch eine Punktmutation, die das Protein destabilisiert, zu dieser Verkürzung kommen.

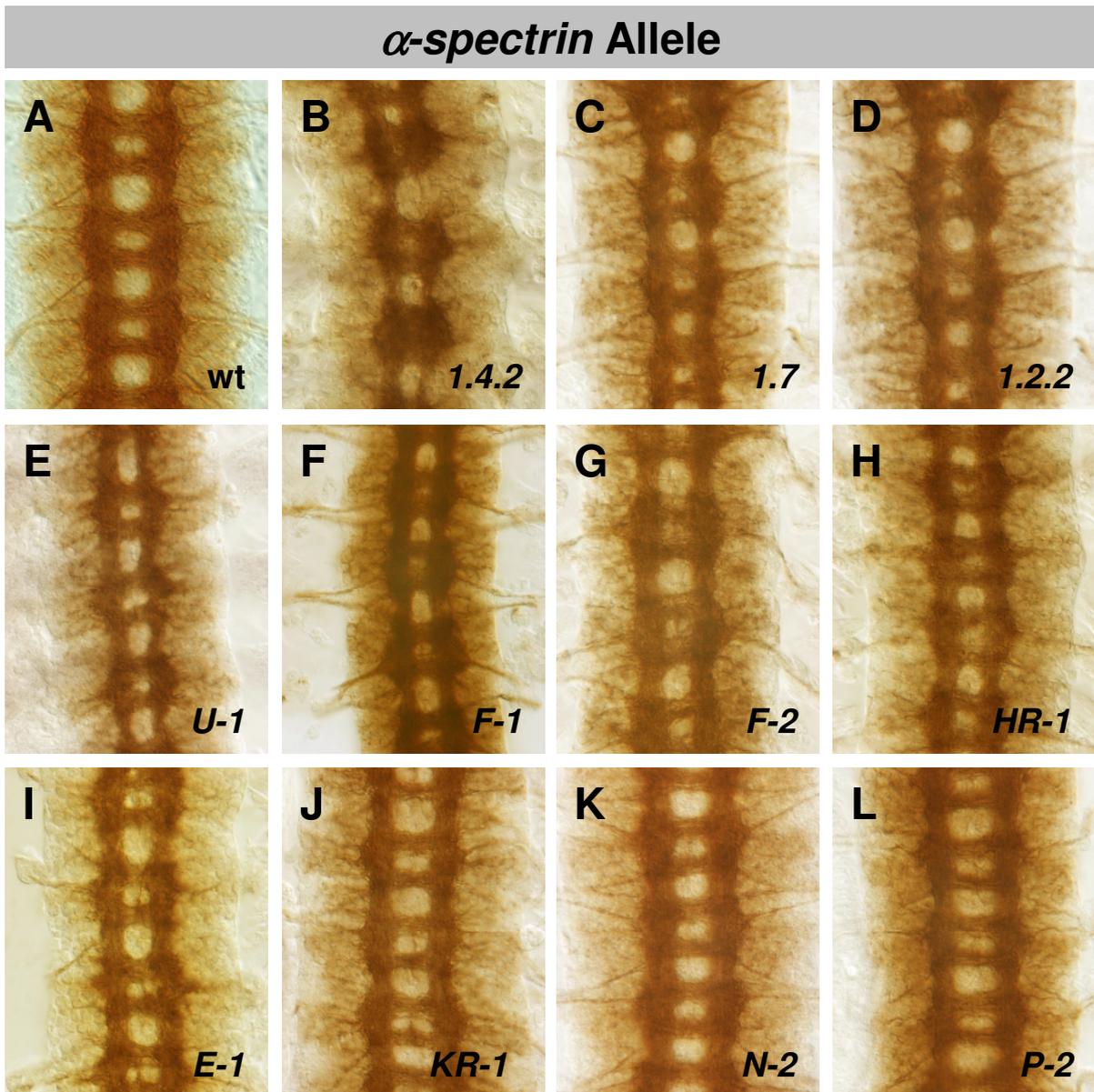
### 3.1.4.7 Phänotypische Analyse der Mutanten

Die aus dem Screen erhaltenen Mutanten wurden auf Defekte im embryonalen Axonmuster hin untersucht. Dazu wurden Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper BP102 durchgeführt. Dieser markiert die Axontrakte des ZNS. Dabei zeigte sich, dass die *discs lost* und alle potentiellen *no name yet* Allele ein

## *discs lost* und *no name yet* Allele



**Abb. 29: Embryonale ZNS-Phänotypen I.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Das axonale Muster wurde über den mAb BP102 immunhistochemisch dargestellt. Die Embryonen wurden bis zur Fixierung bis zu zwei Tage bei 4°C gelagert (siehe Text). Alle *discs lost* und *no name yet* Allele zeigen homozygot ein weitgehend wildtypisches Axonmuster im ZNS.



**Abb. 30: Embryonale ZNS-Phänotypen II.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Das axonale Muster wurde über den mAb BP102 immunhistochemisch dargestellt. Die Embryonen wurden vor der Fixierung bis zu zwei Tage bei 4°C gelagert (siehe Text). Es ist eine Auswahl der isolierten *α-spectrin/klötzchen* Allele gezeigt. In den homozygoten Embryonen finden sich Mutanten mit stark fusionierten Kommissuren (B, 1.4.2), Mutanten mit intermediären Phänotypen (G, F-2 und H, HR-1), aber auch wildtypische ZNS Muster (K, N-2 und L, P-2).

## Ergebnisse

weitgehend wildtypisches BP102 Muster zeigen (Abb. 29). Innerhalb der  $\alpha$ -*spectrin* Allele wurden allerdings ZNS Phänotypen gefunden. Den stärksten BP102 Phänotyp zeigte dabei das Allele 1.4.2 (Abb. 30 B). Es weist deutlich fusionierte Kommissuren auf und die Konnektive sind oft verdünnt und zum Teil ganz unterbrochen. Eine Analyse in trans zu den Defizienzen *Df(3L)Aprt32* und *Df(3L)My10* zeigte aber, dass dieser starke Phänotyp nicht mit der  $\alpha$ -*spectrin* assoziierten Letalität zusammenhängt (Daten nicht gezeigt). Eine Reihe weiterer Allele (1.7, 1.2.2, U-1, F-1 und F-2) zeigt ebenfalls einen fusionierte Kommissuren Phänotyp (Abb. 30), der jedoch deutlich schwächer ausgeprägt ist, als dies z.B. für die bereits beschriebenen *klötzchen* EMS Allele E2-26 und D4-64 der Fall ist (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b; Pielage, 2002). Zwar liegen die Kommissuren eines Segments enger zusammen, jedoch wird immer deutlich ein interkommissuraler Raum gebildet. Der Phänotyp ist allerdings recht variabel und es sind auch immer wildtypische Embryonen zu finden. Auch weitere Allele wie z.B. J-1 und E-1 zeigten vereinzelt Tiere mit leicht fusionierten Kommissuren. Um den Einfluss von Hintergrundmutationen auf die Ausprägung des ZNS Phänotyps möglichst gering zu halten, wurde das BP102 Muster in trans zu den Defizienzen *Df(3L)Aprt32* und *Df(3L)My10* analysiert. Dabei kommt es zu einer weiteren Abschwächung des Phänotyps. Allerdings treten nach wie vor vereinzelt Tiere mit eindeutigem ZNS Phänotyp auf (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der unerwartet schwachen Ausprägung des fusionierte Kommissuren Phänotyps in allen  $\alpha$ -*spectrin* Allelen wurde die phänotypische Charakterisierung der bereits beschriebenen *klötzchen* Allele in trans zueinander oder in trans zu Defizienzen wiederholt. Auch hier zeigte sich, dass die mutanten Tiere zwar eindeutig fusionierte Kommissuren aufwiesen, aber die Ausprägung deutlich schwächer war als beschrieben (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b; Pielage, 2002).

Nachdem die Korrektheit der Stämme und die Funktionalität der  $\beta$ -Galaktosidase Markierung der Balancerchromosomen überprüft wurden, mussten andere Faktoren für die Diskrepanz in der Beschreibung der Phänotypen verantwortlich sein.

### 3.1.4.8 Der *klötzchen* Phänotyp ist kältesensitiv

Generell fiel in den Ablagen auf, dass oft sehr alte Embryonen ein weitgehend wildtypisches Axonmuster im ZNS aufwiesen, wohingegen jüngere Embryonen

## Ergebnisse

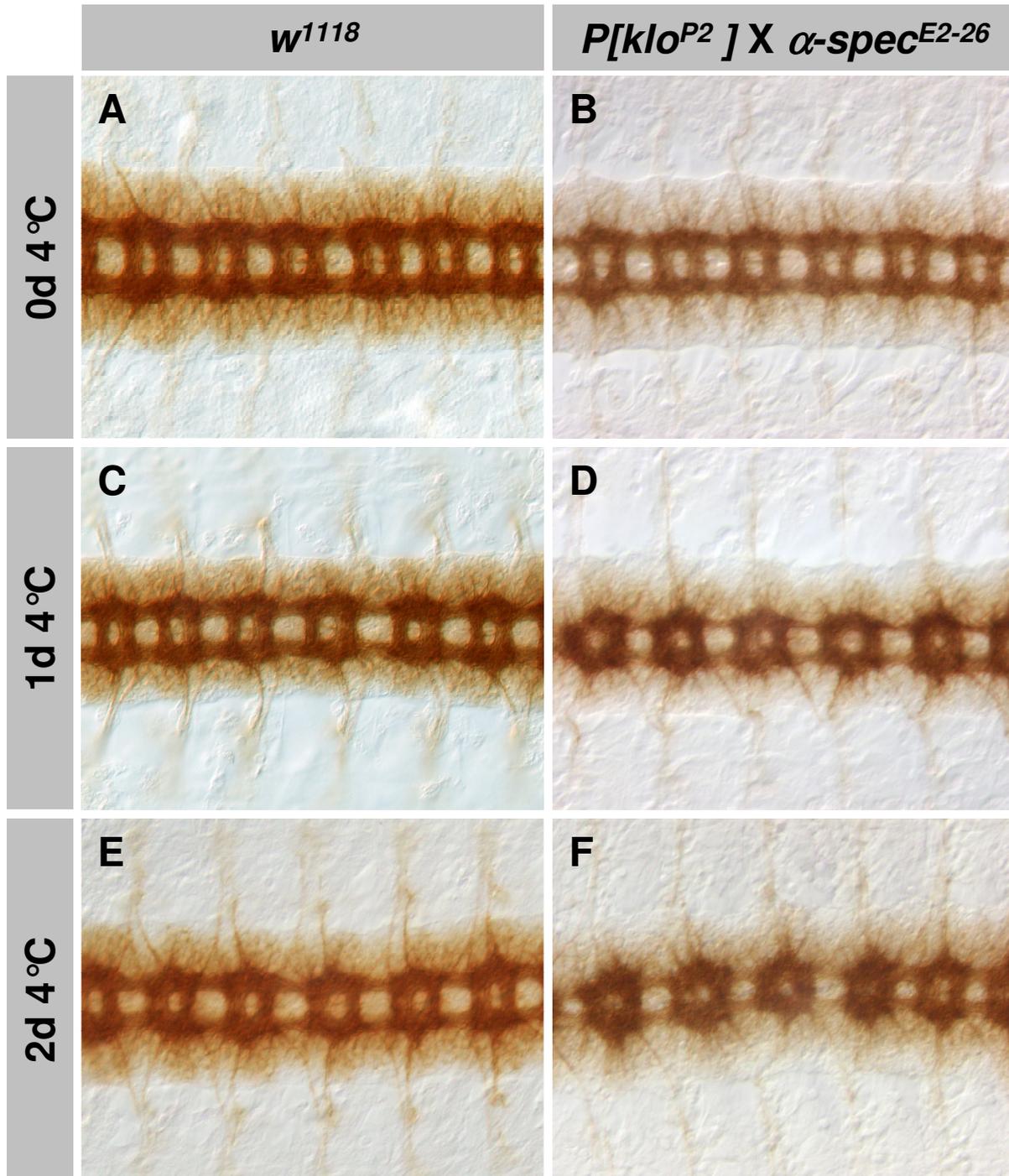
stärker beeinträchtigt waren. Es könnte sein, dass sich der frühe Phänotyp in den Mutanten in späteren Stadien durch eventuell redundante Sicherungssysteme schwächer ausprägte. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da der Phänotyp in den frühen Stadien oft sehr deutlich war und in späten Stadien aber fast wildtypische Embryonen beobachtet werden konnten.

Es scheint wahrscheinlicher, dass es sich um einen Effekt handelt, der durch die Art der Lagerung der Embryonen bis zur Fixierung verursacht wird. Die Embryonen wurden bis zu 2 Tage bei 4°C gesammelt, wobei die Agarplatten morgens und abends gewechselt wurden, so dass bis zur Fixierung etwa ein Drittel der Embryonen 2 Tage bei 4°C, ein Drittel 1 Tag bei 4°C und das letzte Drittel gar nicht bei 4°C inkubiert wurde (Hummel et al., 1997b). Dieses Verfahren wurde standardmäßig im Labor eingesetzt und führte in groß angelegten phänotypischen Screens zu der Identifizierung diverser Mutanten mit qualitativ unterschiedlichen embryonalen ZNS und PNS Phänotypen (Edenfeld, 2004; Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b; Schimmelpfeng et al., 2001).

Um zu prüfen, ob die Inkubation bei 4°C einen Einfluss auf die Ausprägung des *klötzchen* Phänotyps hat, wurden die Embryonen 2 Tage, 1 Tag und 0 Tage bei 4°C inkubiert und die ZNS Phänotypen der Mutanten analysiert.

Tatsächlich zeigte sich ein deutlicher Einfluss der 4°C Inkubation. So zeigten verschiedene *α-spectrin/klötzchen* Allele eine deutliche Abschwächung des ZNS Phänotyps, wenn sie nicht bei 4°C inkubiert wurden. Selbst die als besonders stark beschriebenen *klötzchen* Allele wie *E2-26*, *P[kloP2]* oder *Df(3L)My10* (Bhat et al., 1999; Pielage, 2002) zeigten in Homozygose kaum noch Defekte. Bereits durch einen Tag Inkubation bei 4°C konnten in diesen Mutanten aber deutliche *klötzchen* Phänotypen induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss von Hintergrundmutationen zu minimieren, wurde das P-Element induzierte *klötzchen* Allel *klötzchen*<sup>*P[kloP2]*</sup> in trans zu *klötzchen*<sup>*E2-26*</sup> analysiert (Abb. 31). Es zeigte sich, dass diese Kombination ohne 4°C Behandlung ein absolut wildtypisches Axonmuster im embryonalen ZNS zeigte. Durch die Inkubation bei 4°C ließ sich schon nach einem Tag ein *klötzchen*-artiger Phänotyp induzieren. So war der interkommissurale Raum deutlich verkleinert und die Konnektive waren stark verdünnt (Abb. 31 D). Dieser Phänotyp verstärkte sich durch eine zweitägige Lagerung der Embryonen bei 4°C. Der interkommissurale Raum war sehr stark



**Abb. 31:  *$\alpha$ -spectrin* zeigt einen kältesensitiven ZNS-Phänotyp I.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Das axonale Muster wurde über den mAb BP102 immunhistochemisch dargestellt. Die Embryonen wurden wie in der Abbildung angegeben 0 Tage, 1 Tag oder 2 Tage bei 4°C inkubiert und dann fixiert (siehe Text). (B) Das P-Element induzierte klötchen Allel *P[klo*<sup>P2</sup>*] in trans zu klötchen*<sup>E2-26</sup> zeigt ohne Kältbehandlung ein wildtypisches ZNS. (D und F) Werden die Embryonen einen oder zwei Tage bei 4 °C gehalten, kommt es zu deutlich fusionierten Kommissuren. (F) Nach zwei Tagen 4°C zeigt sich ein deutlicher, *klötchen*-ähnlicher Phänotyp. (E) Auch im Wildtyp (*w*<sup>1118</sup>) wird durch Kälte eine leichte Fusion der Kommissuren induziert, diese ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt.

## Ergebnisse

reduziert und manchmal konnte eine vollständige Fusion beobachtet werden. Auch die Konnektive waren extrem verdünnt (Abb. 31 F).

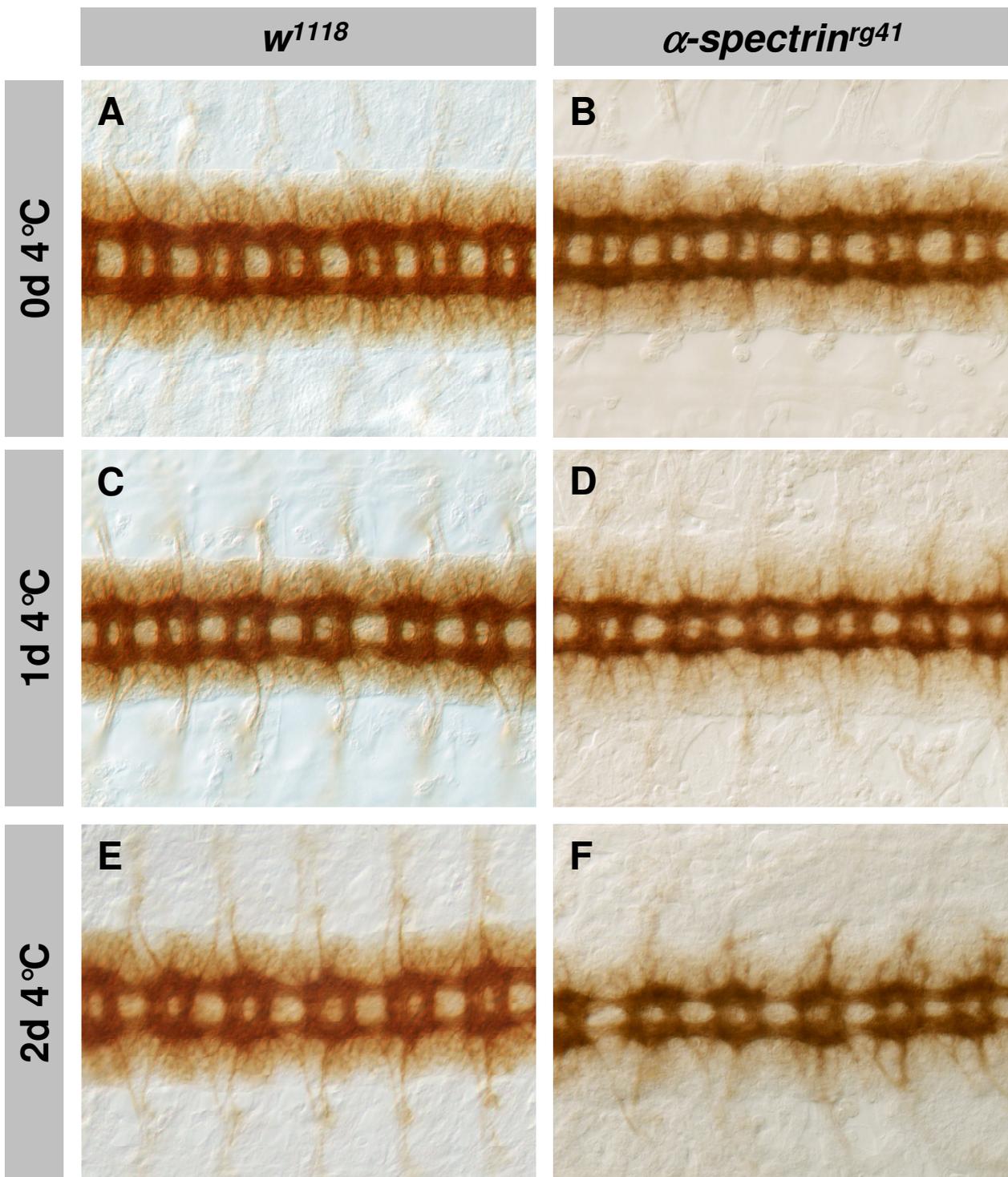
Auch die Wildtyp Kontrolle ( $w^{1118}$ ) zeigte leichte Defekte, die durch Kältebehandlung verursacht wurden. Hier kommt es, vor allem bei 2 Tagen Inkubation bei 4°C, zu einer leichten Verdünnung der Kommissuren und einer Einengung des interkommissuralen Raums (Abb. 31 E). Diese Defekte sind aber deutlich schwächer ausgeprägt als in der *klötzchen/α-spectrin* mutanten Situation.

### 3.1.4.9 Die *α-spectrin* Mutante zeigt nach Kältebehandlung *klötzchen*-artige Phänotypen

Es wurde geprüft ob Mutationen in *α-spectrin* für die Kältesensitivität des *klötzchen* Phänotyps verantwortlich sind, indem der ZNS Phänotyp des *α-spectrin* Nullallels *rg41* untersucht wurde. Auch hier zeigt sich eine kälteabhängige Induktion eines *klötzchen*-artigen ZNS Phänotyps (Abb. 32 D und F). Dieser Phänotyp war schwächer ausgeprägt als in *klötzchen<sup>P[kloP2]</sup>/klötzchen<sup>E2-26</sup>* Tieren. Nach einem Tag 4°C Inkubation kommt es zwar zu einer leichten Reduktion des interkommissuralen Raumes, die Konnektive sind im Vergleich zur Wildtypkontrolle jedoch nur wenig verdünnt. Nach zwei Tagen sind in *α-spectrin<sup>rg41</sup>* Mutanten auch die Konnektive deutlich verdünnt (Abb. 32 F).

### 3.1.4.10 Möglicher Einfluss von Hintergrundmutationen

Da die Kältesensitivität des *α-spectrin<sup>rg41</sup>* Allels schwächer ausgeprägt ist, als in *klötzchen<sup>P[kloP2]</sup>/klötzchen<sup>E2-26</sup>* transheterozygoten Tieren, sind wahrscheinlich weitere Hintergrundmutationen für die Diskrepanz verantwortlich. So trägt das *P[kloP2]* Chromosom mindestens die zusätzlichen Letalfaktoren *discs lost* und *no name yet*. Durch das Einkreuzen der *ubi-α-spectrin* und *ubi-discs lost* Konstrukte ließ sich *klötzchen<sup>P[kloP2]</sup>* aber nicht zu spät larvaler Letalität retten, wie dies erwartet worden war. Das heißt, neben *nny* ist hier mindestens ein weiterer Letalfaktor vorhanden. Dies gilt auch für *klötzchen<sup>E2-26</sup>* oder *klötzchen<sup>D4-65</sup>*. Diese Allele lassen sich in Homozygose durch die Expression des *α-spectrin* Minigens (*ubi-α-spectrin*) nicht zu Vitalität retten. Sie zeigen im Vergleich zu *α-spectrin<sup>rg41</sup>* eine viel deutlichere Kältesensitivität und eine 4°C Behandlung führte zu den sehr starken, namensgebenden ZNS Phänotypen (vgl. auch Einleitung). Die Chromosomen *klötzchen<sup>E2-26</sup>* und *klötzchen<sup>D4-65</sup>* wurden daraufhin durch Rekombination gegen ein *ru*



**Abb. 32: *α-spectrin* zeigt einen kältesensitiven ZNS-Phänotyp II.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Das axonale Muster wurde über den mAb BP102 immunhistochemisch dargestellt. Die Embryonen wurden wie in der Abbildung angegeben 0 Tage, 1 Tag oder 2 Tage auf 4°C inkubiert und dann fixiert (siehe Text). Das *α-spectrin* Nullallel *rg41* zeigt einen kälteinduzierten ZNS Phänotyp. Die Ausprägung ist in *rg41* Embryonen aber schwächer als in *P[klo<sup>P2</sup>]/α-spectrin<sup>E2-26</sup>* (vgl. Abb. 31).

## Ergebnisse

*cu ca* Chromosom von allen letalen Mutationen im Hintergrund gereinigt. Diese gereinigten Chromosomen zeigten bei 4°C Behandlung nun vergleichbare, kälteinduzierte Phänotypen wie *α-spectrin<sup>rg41</sup>* (Daten nicht gezeigt).

In Tabelle 11 ist gezeigt, dass auch andere ursprüngliche *klötzchen* Chromosomen letale Hintergrundmutationen tragen. Unter Umständen können diese Hintergrundmutationen auch in Heterozygose zu einer verstärkten Kältesensitivität im *α-spectrin* mutantern Hintergrund führen. Zusätzlich ist es möglich, dass es vitale Mutationen gibt, die ebenfalls einen Einfluss auf die Kälteresistenz haben.

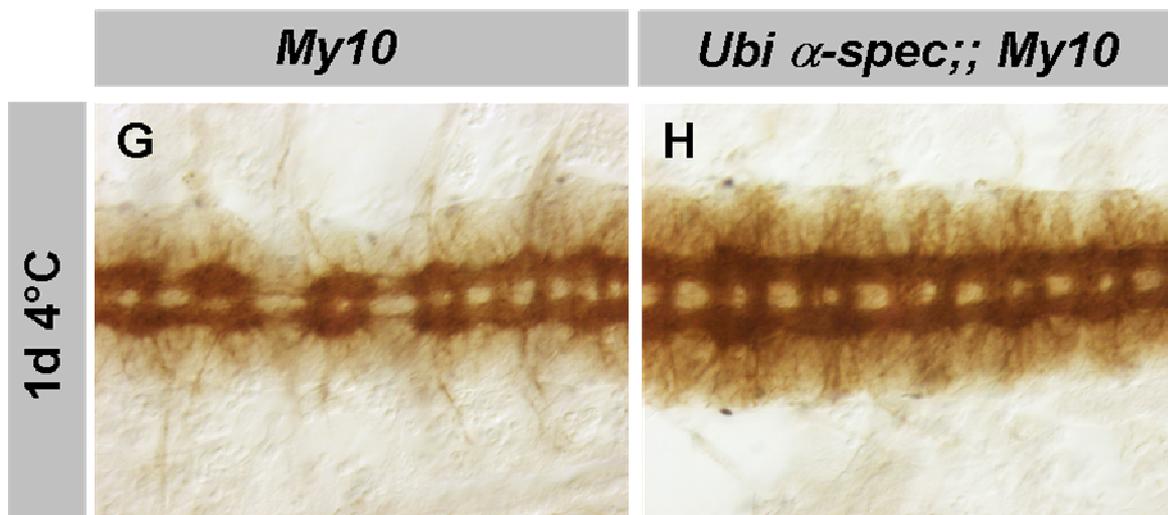
Die Stärke der kältesensitiven Phänotypen zeigte in Wiederholungen von Experimenten eine deutliche Variabilität. Dies machte es nötig alle zu vergleichenden Genotypen in einem einzigen Experiment zu bearbeiten. Aufgrund dieser Variabilität wurde der Einfluss der Kältebehandlung im Zusammenhang mit Hintergrundmutationen nicht weiter verfolgt.

Allele	Rettung durch	
	<i>ubi-α-spec</i>	<i>ubi-α-spec + ubi-discs lost</i>
<b><i>E2-26*</i></b>	-	n.d.
<b><i>E2-26</i> gereinigt</b>	+	n.d.
<b><i>P[kloP2]</i></b>	-	-
<b><i>P[discs lost<sup>595/4</sup>]</i></b>	-	-
<b><i>Df(3L)My10*</i></b>	-	-
<b><i>Df(3L)My10*/P[discs lost<sup>595/4</sup>]</i></b>	-	-
<b><i>Df(3L)My10*/P[kloP2]</i></b>	pupal	n.d.
<b><i>Df(3L)My10 FRT/P[discs lost<sup>595/4</sup>]</i></b>	pupal	n.d.

**Tab. 11: Hintergrundmutationen einiger *klötzchen* Allele.** Gezeigt ist, ob sich verschiedene *klötzchen* Mutanten durch die Expression von *ubi-α-spectrin* oder *ubi-α-spectrin* und *ubi-discs lost* retten lassen. – bedeutet keine Rettung, + vollständige Rettung zu Vitalität, pupal: Rettung bis zum Puppenstadium, n.d.: Rettung wurde nicht bestimmt. Ein Stern zeigt an, dass es sich um ungereinigte Chromosomen handelt.

### 3.1.4.11 Rettung des *klötzchen* Phänotyps durch *ubi- $\alpha$ -spectrin*

Um die These weiter zu stützen, dass der Verlust von  $\alpha$ -spectrin für den temperaturabhängigen ZNS Phänotyp verantwortlich ist, wurde getestet ob der deutliche *klötzchen* Phänotyp der Defizienz *My10* (1 Tag 4°C) durch die Expression von  $\alpha$ -Spectrin gerettet werden kann (Abb. 33). Tatsächlich führt die Expression des  $\alpha$ -spectrin Minigenes zu einer Abschwächung des ZNS Phänotyps. Vor allem die in *Df(3L)My10* mutanten Tieren sehr stark verdünnten Konnektive sind weitgehend wieder hergestellt (Abb. 33). Hier zeigt sich also, dass Mutationen in  $\alpha$ -spectrin tatsächlich für den kältesensitiven *klötzchen*-Phänotyp verantwortlich sind.

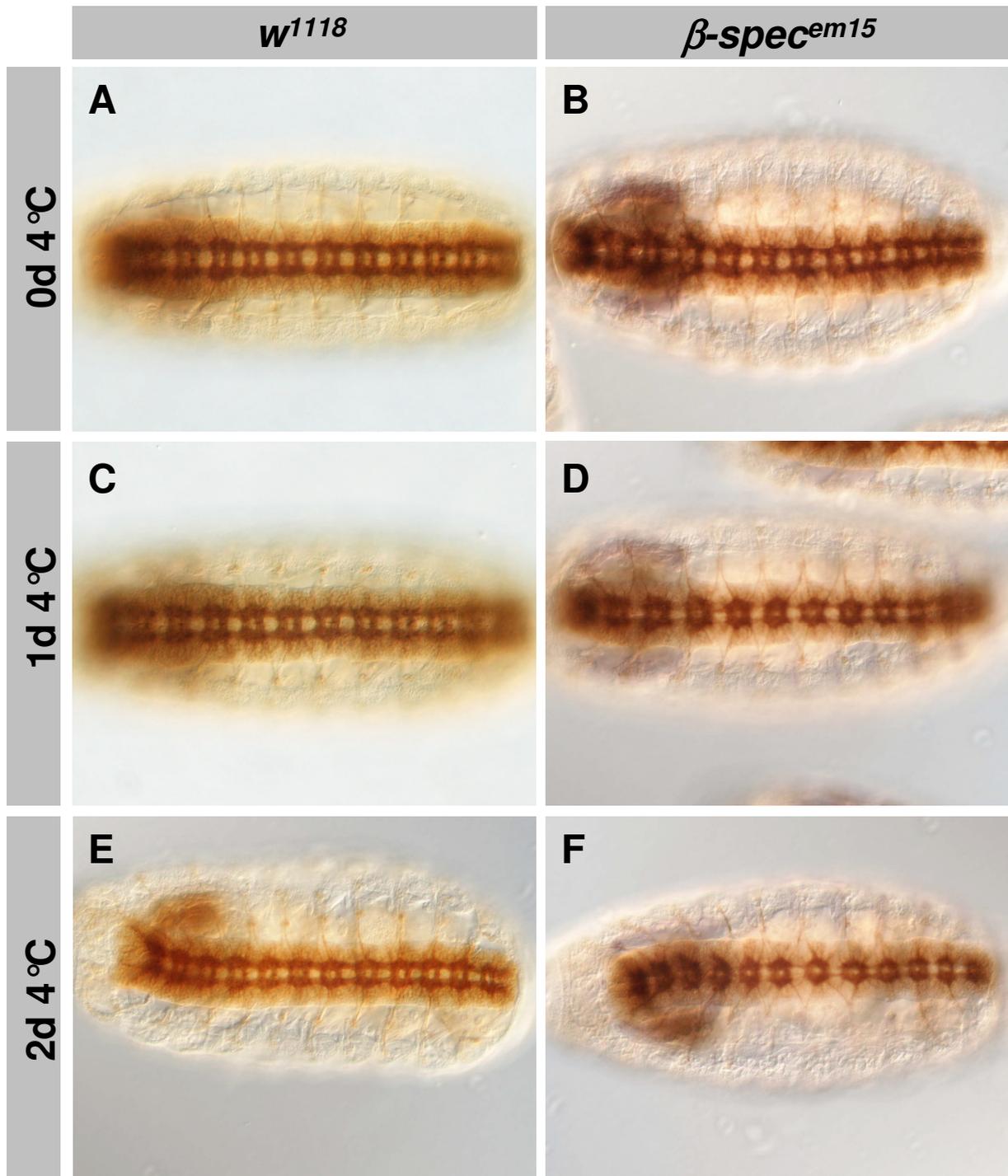


**Abb. 33: Rettung des *klötzchen* Phänotyps durch die Expression von  $\alpha$ -Spectrin.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Das axonale Muster wurde über den mAb BP102 immunhistochemisch dargestellt. Die Embryonen wurden 1 Tag auf 4°C inkubiert und dann fixiert (siehe Text). *Df(3L)My10* zeigt unter diesen Bedingungen einen *klötzchen* Phänotyp. Durch die Expression von  $\alpha$ -Spectrin über das *ubi- $\alpha$ -spectrin* Minigen kommt es zu einer Abschwächung des Phänotyps.

### 3.1.4.12 $\beta$ -spectrin zeigt Kältesensitivität

Da  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spectrin ein Heterotetramer bilden und zumindest einen Großteil ihrer Funktionen nur gemeinsam ausführen können (Bennett and Baines, 2001; De Matteis and Morrow, 2000), wurde getestet, ob eine Mutation in  $\beta$ -spectrin ebenfalls zum *klötzchen*-artigen ZNS Phänotyp führen kann. Dazu wurden Embryonen des  $\beta$ -spectrin Allels *em15* unterschiedlich lang bei 4°C gelagert und anschließend das Axonmuster des ZNS phänotypisch untersucht (Abb. 34).

Im Gegensatz zu  $\alpha$ -spectrin zeigt die  $\beta$ -spectrin Mutante auch ohne 4°C Behandlung einen schwachen ZNS Phänotyp (Abb. 34). So ist der interkommissurale Raum in



**Abb. 34: *β-spectrin* zeigt einen kältesensitiven ZNS-Phänotyp.** Ventralansicht von Stadium 16 Embryonen. Das axonale Muster wurde über den mAb BP102 immunhistochemisch dargestellt. Die Embryonen wurden wie in der Abbildung angegeben 0 Tage, 1 Tag oder 2 Tage auf 4°C inkubiert und dann fixiert. Das stark hypomorphe *β-spectrin* Allel *em15* zeigt einen kälteinduzierten, *klötzchen* ähnlichen ZNS Phänotyp. Die Ausprägung ist in *β-spec<sup>em15</sup>* Embryonen deutlich stärker als in *α-spec<sup>g41</sup>* Embryonen (vgl. Abb. 32).

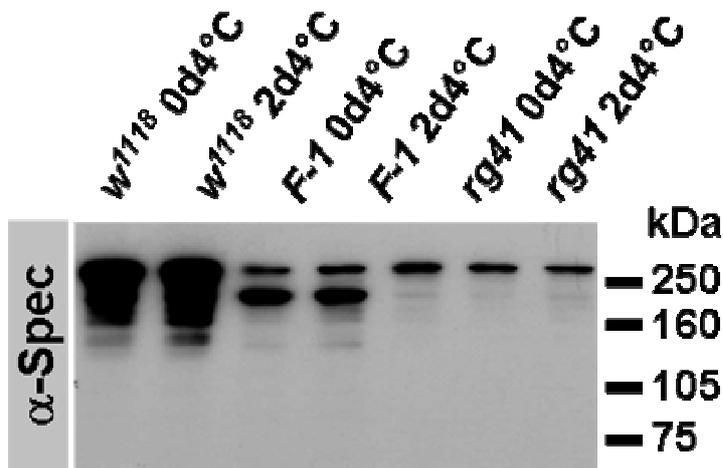
## Ergebnisse

manchen Segmenten etwas kleiner und vor allem sind die Konnektive verdünnt. Inkubation bei 4°C verstärkt den Effekt dramatisch. In *em15* kommt es schon nach einem Tag zu heftigen Effekten. Die Konnektive sind extrem verdünnt und die Kommissuren sind stark fusioniert, obwohl stets ein interkommissuraler Raum erhalten bleibt. Dieser Phänotyp ist fast identisch mit dem *klötzchen/α-spectrin* Phänotyp (vgl. Abb. 32). Dies deutet darauf hin, dass das Spectrin Cytoskelett möglicherweise eine Resistenz gegen Kältestress vermittelt.

### 3.1.4.13 α-Spectrin Proteinlevel ändern sich durch Kältebehandlung nicht

Eine alternative Erklärung wäre, dass durch die Kältebehandlung die Spectrin Expression oder Stabilität reduziert ist. Dies könnte dann in einer zygotischen *α-spectrin* Mutante dazu führen, dass die aktive, maternale Komponente reduziert ist, und es damit früher in der Entwicklung zu Störungen kommt.

Um diese These zu testen wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurden embryonale Lysate von *α-spectrin* mutanten Embryonen ohne und mit zwei Tagen 4°C Behandlung gewonnen und dann in einem Western Blot die α-Spectrin Proteinmenge verglichen (Abb. 35).



**Abb. 35: Western Blot Analyse der α-Spectrin Expression bei Kältebehandlung.** Es wurden Lysate von *w<sup>1118</sup>*, *α-spec<sup>F-1</sup>* und *α-spec<sup>tg41</sup>* Stadium 17 Embryonen ohne 4°C Lagerung oder mit 2 Tagen 4°C Lagerung hergestellt. Homozygot mutante Embryonen wurden über einen GFP Balancer selektioniert. In keiner der Genotypen konnte eine signifikante Reduktion der α-Spectrin Proteinmenge beobachtet werden.

## Ergebnisse

Es zeigte weder der Wildtyp ( $w^{1118}$ ), noch die  $\alpha$ -spectrin Mutante *F-1* (verkürztes  $\alpha$ -Spectrin Protein), noch die Nullmutante  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> (nur noch maternales Protein) eine signifikante Reduktion der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge.

### 3.1.4.14 Maternale $\alpha$ -Spectrin Expression

Es wurde versucht, die maternale  $\alpha$ -Spectrin Expression zu minimieren, um eventuelle frühere Funktionen von  $\alpha$ -Spectrin während der embryonalen Entwicklung des ZNS zu untersuchen. Dies stellte sich jedoch als schwierig dar. So wurde versucht  $\alpha$ -Spectrin durch die frühe Expression eines UAS  $\alpha$ -spectrin<sup>RNAi</sup> Konstruktes zu reduzieren (Pielage, 2002; Pielage et al., 2005). Die Konstrukte sind im Prinzip funktionell (Abb. 9 A), jedoch ist die Gal4/UAS RNAi Methode in der Regel in embryonalen Stadien wenig wirksam (B. Dickson persönliche Mitteilung). Damit über das RNAi Konstrukt die maternale Expression reduziert wird, wurde das  $\alpha$ -spectrin<sup>RNAi</sup> Konstrukt in einem  $\alpha$ -spectrin mutanten Hintergrund ubiquitär im Embryo exprimiert. Jedoch führte auch dieser Ansatz nicht zu einem ZNS Phänotyp. Aus technischen Gründen konnte bisher nicht überprüft werden, ob es tatsächlich zu einer Reduktion der maternalen  $\alpha$ -Spectrin Expression gekommen ist.

Eine andere Strategie, die maternale Komponente auszuschalten, sind Keimbahnklone. Diese sind für  $\alpha$ -spectrin aber mit dem Nullallel  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> nicht zu erhalten, da  $\alpha$ -Spectrin für die Oogenese essentiell ist (de Cuevas et al., 1996). In dieser Arbeit wurden einige neue schwache Allele generiert, deren Funktion eventuell für die Oogenese ausreicht, aber doch zu einer Reduktion der maternalen  $\alpha$ -Spectrin Funktion führen kann. Dazu wurden über eine Hitzeschock induzierbare Expression der Flipase  $\alpha$ -spectrin Klone in der Keimbahn induziert. Über die *ovoD* FRT Technik wird sichergestellt, dass nur  $\alpha$ -spectrin mutante Eier gebildet werden können (Chou et al., 1993; Chou and Perrimon, 1996; Xu and Rubin, 1993). Für die Kreuzung wurden ca. 50 Jungfrauen des Genotyps *hsFLP*; ; *ovoD* FRT 80B/ $\alpha$ -spectrin<sup>-</sup> FRT 80B gegen *rg41*/TM6B<sup>Ubx-lacZ</sup> Männchen gekreuzt. Die mitotische Rekombination in der Keimbahn wurde durch larvale Hitzeschocks ausgelöst (Chou and Perrimon, 1996). Als Wildtypkontrolle wurde ein *ry*<sup>506</sup> FRT 80B Chromosom benutzt. Es zeigte sich, dass mit dieser Technik nur sehr wenige Embryonen gewonnen werden konnten. Selbst nach sechs Fixierungen (ohne 4°C Lagerung) konnten für die Wildtypkontrolle nur 262 Embryonen gewonnen werden (siehe Tab.

## Ergebnisse

12). Auch in Keimbahnklonen von  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> traten Eier auf. Zwar wurden hier nur 8 (!) Eier gefunden, da aber erwartet wurde, dass  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> mutante Ovarien nicht in der Lage sind, überhaupt reife Oocyten zu entwickeln, ist dies ungewöhnlich (de Cuevas et al 1996). Es ist unklar, ob es sich eventuell um einen Effekt der ovoD FRT Technik handelt, der generell auftreten kann. Aufgrund der geringen Anzahl der gewonnenen Eier konnte keine Färbung des ZNS Musters durchgeführt werden.

Für die schwachen Allele S-1, P-2 und N-2 erhielt man deutlich mehr Embryonen (Tab. 12). Die Zahlen liegen aber deutlich unter denen der Wildtypkontrolle. Trotzdem zeigte sich, dass es mit schwachen  $\alpha$ -spectrin Allelen möglich ist, Keimbahnklone zu generieren. Es konnte eine erste Analyse des ZNS in diesen Keimbahnklonen durchgeführt werden. Dabei zeigten die drei schwachen Allele ein vergleichbares Bild. Etwa 9% (n=13 Embryonen) der mutanten Embryonen zeigten dabei qualitativ unterschiedliche ZNS Phänotypen (Daten nicht gezeigt). Es konnten aber keine klötzchen typischen Phänotypen, wie fusionierten Kommissuren oder verdünnte Konnektive, beobachtet werden.

Da bisher zu wenig mutante Embryonen untersucht wurden und z.B. nicht überprüft werden konnte, ob es tatsächlich zu einer Abnahme des maternalen  $\alpha$ -Spectrin Proteins gekommen ist, lässt sich keine endgültige Aussage über eine frühere Funktion von  $\alpha$ -Spectrin in der Embryogenese machen. Es konnte hier keine Funktion für die Aufrechterhaltung des interkommissuralen Raums oder für die korrekte Bildung der Konnektive gezeigt werden.

<i>ry</i> <sup>506</sup>	<i>rg41</i>	<i>S-1</i>	<i>P-2</i>	<i>N-2</i>	Allel
262	8	59	109	129	X <i>rg41</i> ♂♂

**Tab.12 : Keimbahnklone für  $\alpha$ -spectrin Allele.** Angegeben ist die Zahl der erhaltenen Embryonen aus der Kreuzung *hsFLP*;; *ovoD FRT 80B*/ *$\alpha$ -spectrin* FRT 80B X *rg41/TM6B<sup>Ubx-lacZ</sup>*. Das FRT *ry*<sup>506</sup> Chromosom diente dabei als Wildtypkontrolle. Die Hälfte der erhaltenen Keimbahnklone wurde durch das paternale Balancerchromosom gerettet, die andere Hälfte zeigt maternale und zygotische Expression des jeweiligen mutanten  *$\alpha$ -spectrin* Chromosoms. Details siehe Text.

### 3.1.4.15 Allgemeine Stressresistenz

Da  *$\alpha$ -spectrin* eventuell eine Rolle in der Vermittlung von Resistenz gegen Kältestress hat, wurde untersucht, ob  *$\alpha$ -spectrin* vielleicht eine allgemeine

## Ergebnisse

Zellstressresistenz vermitteln kann. Dazu wurden Embryonen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien UV Strahlung ausgesetzt oder es wurden ihnen Hitzeschocks verabreicht. In beiden Fällen kam es zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung zumindest einiger Embryonen. Es konnte aber kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontrolltieren und  $\alpha$ -spectrin<sup>rg41</sup> Mutanten gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Auch wurde der Einfluss von Kältestress auf den eyFLP Minute generierten Augenphänotyp (vgl. Abschnitt 3.1.4.5) der  $\alpha$ -spectrin Mutanten verstärken kann. Dazu wurden die Tiere ab dem ersten Larvenstadium bis in die späte Puppe täglich für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Diese Behandlung hatte aber keinerlei Effekt auf den Augenphänotyp der Mutanten.

## 3.2 Visualisierung der Mittellinienglia Entwicklung

### 3.2.1 Generierung von *in vivo* Markierungen der Mittellinienglia

Um die dynamische Entwicklung der Mittellinienglia besser studieren zu können, wurde versucht entsprechende Werkzeuge für eine *in vivo* Beobachtung zu generieren. Über eine GFP (Green Fluorescent Protein) Markierung der Mittellinienglia sollte dann deren Entwicklung im Wildtyp aber auch im mutanten Hintergrund verfolgt werden können (Brand, 1999; Keleman et al., 2005; Murray et al., 1998; Ribeiro et al., 2004). Dazu wurden verschiedene UAS GFP Konstrukte mit dem Mittellinienglia Treiber *slit*-Gal4 (Stollewerk and Klämbt, 1997) exprimiert und die Insertionen wurden auf Beginn und Stärke der Fluoreszenz getestet. Auch wurde untersucht, wie gut die Morphologie der Mittellinienglia dargestellt ist und ob eventuell toxische Effekte auftreten (Tab. 13).

Dabei zeigte sich, dass bei starker Expression eine *in vivo* Markierung der Mittellinienglia schon ab Stadium 13 möglich ist. Zwar exprimiert der *slit*-Gal4 Treiber bereits kurz nach Einleitung der Delamination der Mittellinienglia im frühen Stadium 12, da das GFP Protein aber erst eine Reifung durchlaufen muss kommt es zu einer Verzögerung im Auftreten der Fluoreszenz (Sniegowski et al., 2005; Tsien, 1998). Mit UAS *actin*-GFP und UAS *tau*-GFP war es möglich mit einem Epifluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Spinning Discs Mikroskop (Ultraview RS, Perkin Elmer) die feinen Zellausläufer der Mittellinienglia im Stadium

## Ergebnisse

13 aufzulösen. Dies war mit UAS EGFP2X trotz extrem starker Expression dieser Linie nicht zu bewerkstelligen. Offenbar ist die Konzentration des cytoplasmatischen EGFPs hier zu gering und Cytoskelett assoziierte Fluoreszenzmarker haben hier deutliche Vorteile.

	markierte Struktur	Expressionsstärke	Markierung der Zellmorphologie	früheste Fluoreszenz	Toxizität
<i>cd8GFP*</i>	Zellmembran, Cytoplasma	+	+	St14	-
EGFP 2X*	Cytoplasma	+++	±	St13	-
<i>actin-GFP*</i>	Aktin, Cytoplasma	+	++	St13	±
<i>tau-GFP*</i>	Mikrotubuli, Cytoplasma	++	++	St13	++
nlsGFP	Kern, Cytoplasma	+	-	St15	-
<i>lamin-GFP</i>	Kernmembran	++	-	St13	+++
<i>gap-GFP*</i>	Zellmembran, myristoyliert	+	+	st14	?
<i>dlg-A-EGFP*</i>	Kern, Cytoplasma	+	±	St14	-
<i>myrRFP*</i>	Zellmembran	-	±, RFP-Aggregate	St 16-St17	?
<i>actin-CFP</i>	Aktin, Cytoplasma	-	-	L3 ?	-

**Tab. 13: Übersicht über die Eigenschaften verschiedener fluoreszenter Fusionsproteine.** Die verschiedenen UAS Konstrukte wurden mit *slit*-Gal4 im Embryo getrieben, und die entsprechende Fluoreszenz in den Mittellinienglia nach mehreren Kriterien untersucht (siehe Text). Die Sterne zeigen an, dass für dieses Konstrukt eine Rekombinante mit *slit*-Gal4 generiert wurde. +++: stark; -: sehr schwach.

Das *cd8GFP* Konstrukt, das vor allem die Zellmembran markieren soll und sehr häufig in der Markierung von Neuronen in der Larve oder der adulten Fliege eingesetzt wird (Hummel et al., 2003; Lee and Luo, 1999), zeigte eine zu schwache Expression in den Mittellinienglia, um feine Ausläufer gut zu markieren. Vergleichbares gilt auch für UAS *gap-GFP* und *dlg-A-GFP*. Beide Konstrukte sollten vor allem die Zellmembran markieren. In *dlg-A-GFP* Embryonen tritt eine zusätzliche Markierung des Kerns auf. Das myristoylierte GFP (*gap-GFP*) zeigt in den *slit*-Gal4

## Ergebnisse

markierten Oenocyten der L3 Larve eine sehr ungewöhnliche Morphologie. Während mit anderen GFP-Konstrukten die Oenocyten als große ellipsoide Zellen mit glatten Zellrändern erscheinen, zeigen sie mit der *gap*-GFP Markierung eine sehr unregelmäßige Oberfläche mit flachen, breiten Ausläufern (Daten nicht gezeigt). Ob es sich um einen toxischen Effekt der *gap*-GFP Expression oder um im Wildtyp tatsächlich vorhandene Ausläufer handelt, ist nicht klar.

Um eventuell *in vivo* Doppelmarkierungen durchführen zu können, wurden auch fluoreszente Proteine mit anderen Anregungs- und Emissionsmaxima getestet. Dabei zeigte sich, dass ein *actin*-CFP Fusion (Cyan Fluorescent Protein, ein *Aequorea victoria* GFP Derivat) nur eine äußerst schwache Fluoreszenz zeigte und sich nicht für *in vivo* Studien der Mittellinienglia eignet. Mittels myrRFP (Red Fluorescent Protein), einem monomeren Ds-Red Derivat (*Discosoma sp.*), konnten die Mittellinienglia in sehr späten Embryonen markiert werden. Allerdings ist das Signal erstens nicht sehr stark und zweitens kommt es zu erheblicher Aggregatbildung (Mizuno et al., 2001), so dass sich die Zellmorphologie nur schlecht darstellen lässt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der langen Reifungszeit von Ds-Red und RFP Proteinen (Barolo et al., 2004; Campbell et al., 2002) können frühere Embryonalstadien und damit die eigentliche Dynamik der Mittellinienglia Entwicklung nicht dargestellt werden.

Um die Zellzahl und die Positionierung der Zellkörper von Mittellinienglia *in vivo* zu verfolgen, wurden auch nukleäre Marker getestet. Es konnte beobachtet werden, dass ein GFP mit einer Kernimportsequenz hier nur zu einer schwachen Markierung führte. Dieses Konstrukt zeigt zudem einen hohen Anteil an cytoplasmatischem Signal. Mit einem *lamin*-GFP Konstrukt ließ sich die Kernmembran exzellent darstellen. Hier zeigte sich kaum cytoplasmatisches Signal, so dass sich *lamin*-GFP gut zur Kernmarkierung eignen sollte. Allerdings ist die Kombination *slit*-Gal4/UAS *lamin*-GFP pupal letal, so dass sich keine Rekombinanten generieren ließen. Zwar zeigten sich im Embryo keine offensichtlichen Defekte, jedoch ist die Expression von *lamin*-GFP in der Puppe toxisch. Damit ist fraglich, ob sich dieses Konstrukt für die Analyse von Mutanten sinnvoll einsetzen lässt.

### 3.2.2 Zeitrafferaufnahmen von *slit*-Gal4 UAS GFP Tieren

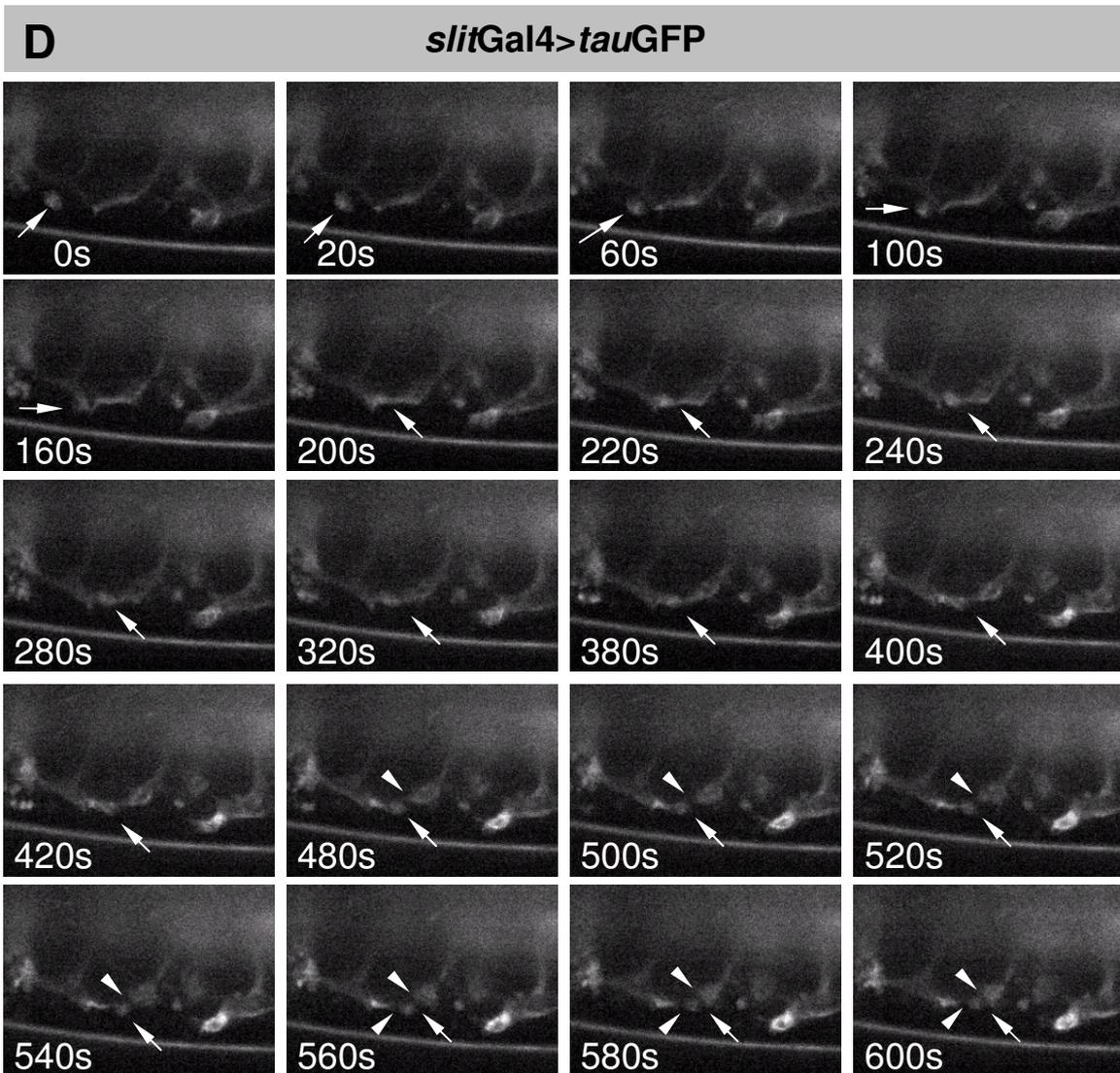
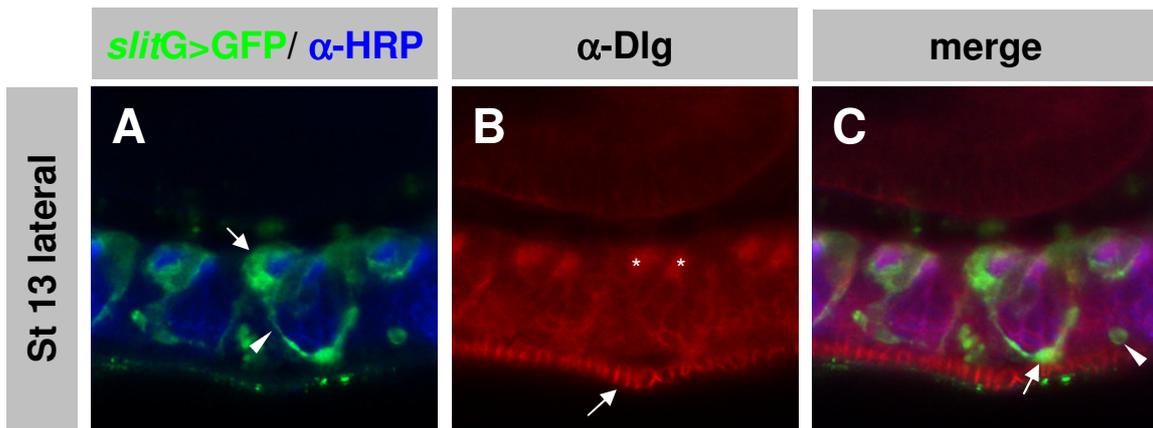
Erste Versuche die Mittellinienglia Entwicklung *in vivo* zu analysieren, wurden mit einer *slit*-Gal4 UAS *tau*-GFP/CyO Rekombinante durchgeführt. Zwar traten in einigen

## Ergebnisse

Embryonen, die die Konstrukte homozygot trugen deutliche Entwicklungsdefekte auf (Daten nicht gezeigt), jedoch waren die heterozygoten Tiere und auch ein Großteil der homozygoten Tiere nicht beeinträchtigt. *tau*-GFP zeigte von den analysierten Konstrukten die stärkste Expression und die beste Markierung der Zellausläufer. Insgesamt stellte sich die Visualisierung als recht schwierig dar, da die optischen Eigenschaften des lebenden Embryos ungünstig sind um weit im Inneren liegende Zellen wie die Mittellinienglia aufzunehmen. Abbildung 36 D zeigt verschiedene Einzelbilder eines Films, der von einem *slit*-Gal4 UAS *tau*GFP Embryo im Stadium 13 gemacht wurde. Mit einem konfokalen Spinning Discs Mikroskop (Perkin Elmer) wurde alle 20 Sekunden eine Aufnahme des Embryos in Lateralansicht gemacht. Die Gesamtlänge des Films beträgt 10 min. Zur besseren Orientierung ist in Abbildung 36 (A-C) eine Antikörperfärbung eines vergleichbaren Stadiums dargestellt. Die Zellkörper liegen bereits in unmittelbarer Nähe der Kommissuren (Abb. 36; A, Pfeil). Die Ausläufer (Abb. 36, A, Pfeilspitze) ziehen nach ventral bis hin zur Epidermis (Abb. 36 B, Pfeil), wo die apikalen Enden der Ausläufer der anterioren und posterioren Mittellinienglia in engem Kontakt zueinander stehen (Abb. 36; C, Pfeil). Zusätzlich sind noch Makrophagen zu erkennen (Abb. 36; C, Pfeilspitze). Ob die Makrophagen durch *slit*-Gal4 selbst markiert werden oder ob sie GFP von sterbenden Mittellinienglia phagozytieren ist noch unklar.

In der Zeitrafferaufnahme (Abb. 36 D) erkennt man die apikalen Zellausläufer der Mittellinienglia, die in unmittelbarer Nähe der Epidermis enden. Während der Aufnahme zog sich ein Ausläufer zurück. Dabei ist auffällig, dass dieses Ereignis scheinbar durch einen Makrophagen (Abb. 36; D Pfeil) begleitet wurde. Der Makrophage wanderte hier in posteriore Richtung, traf auf die Zellausläufer der Mittellinienglia (Abb. 36 D bei etwa 100 Sekunden) und verlangsamte hier seine Bewegung und trat in engen Kontakt mit den Mittellinienglia (Abb. 36 D, bis ca. 320 Sekunden). Anschließend verdünnten sich die Ausläufer der Mittellinienglia um den Makrophagen deutlich oder wurden sogar ganz getrennt (Abb. 36 Pfeilspitzen), so dass der Fortsatz der posterioren Mittellinienglia rückgebildet wurde.

Bisher konnten erst sehr wenige Zeitrafferfilme guter Qualität hergestellt werden, so dass unklar ist, ob dieses Verhalten wirklich typisch ist. Zumindest ergeben sich hier aber Hinweise auf ein enges Zusammenspiel von Mittellinienglia und Makrophagen bei der Rückbildung der apikalen Mittellinienglia Fortsätze. Spätere Stadien wurden in dieser Arbeit bisher wenig untersucht. Die mit dem Spinning Disc Mikroskop zu



**Abb. 36: Analyse der Mittellinienglia Entwicklung.** *slitG>tauGFP* Embryonen im Stadium 13 in Lateralansicht. Anterior ist rechts. (A-C) Antikörperfärbung, die die Lage der Mittellinienglia im Bezug zu Kommissuren (Sterne in B) und Epidermis (Pfeil in B) verdeutlicht. Die Zellkörper (Pfeil in A) der Mittellinienglia liegen an den Kommissuren, die Ausläufer (Pfeilspitze in A) ziehen bis zur Epidermis wo sie engen Kontakt haben (Pfeil in C). (D) Konfokale *in vivo* Aufnahme von *slitG>tauGFP* Embryonen. Einzelbilder eines 600 Sekunden langen Films. Pfeil: Makrophage, Pfeilspitzen: verdünnte Mittellinienglia Fortsätze (Details siehe Text).

## Ergebnisse

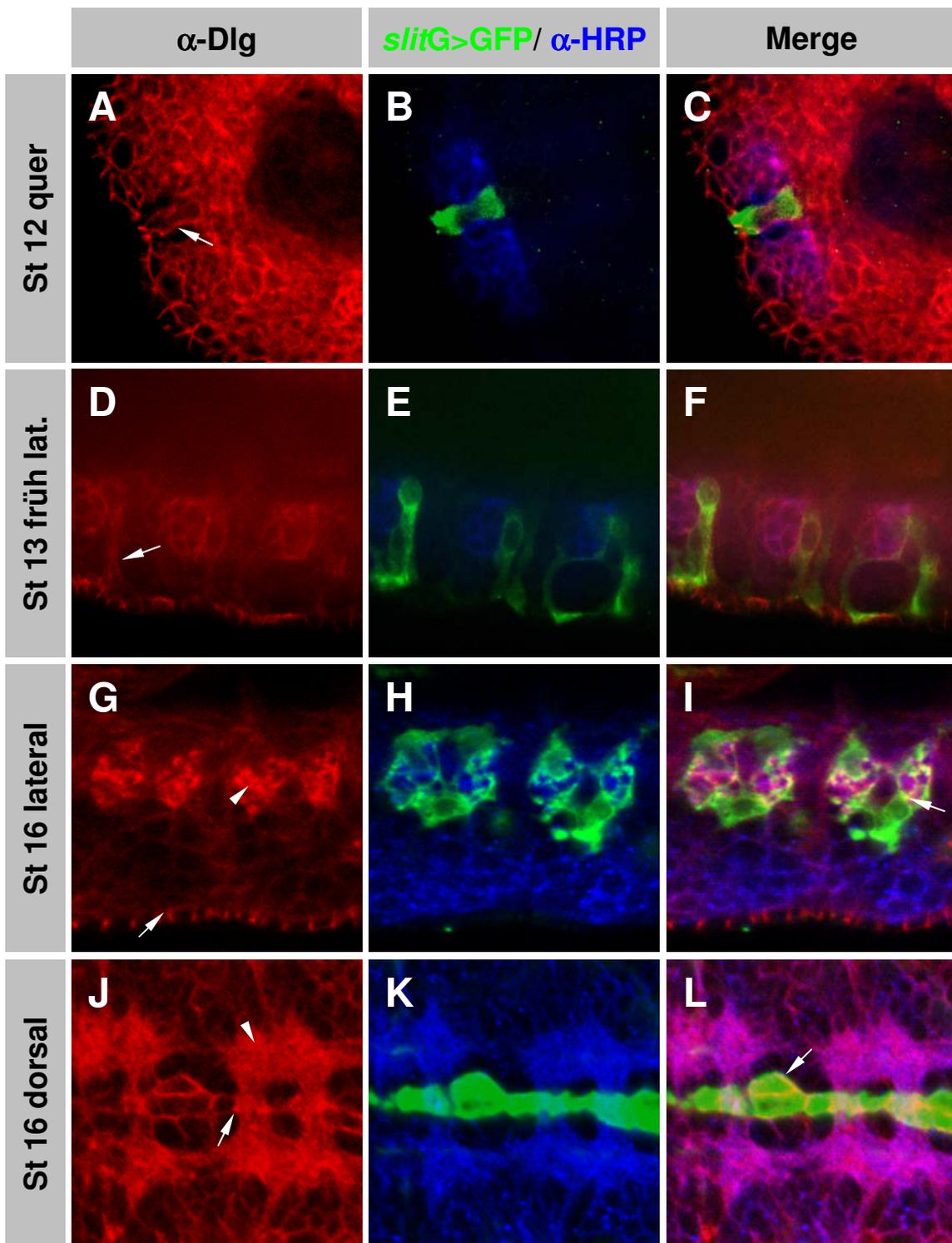
erreichende Auflösung scheint aber nicht auszureichen, um das Umhüllen der kommissuralen Axone durch die Mittellinienglia hinreichend zu visualisieren (siehe Abschnitt 3.3). Die Zellen liegen zu diesem Zeitpunkt weit im Inneren des Embryos. Erschwerend kommt hinzu, dass der *slit*-Gal4 Treiber in späteren Stadien nicht nur in Mittellinienglia exprimiert. Neben einem Signal in Makrophagen und einigen Mittellinienneuronen zeigte sich auch eine erhebliche Expression in ventralen Muskeln und in einigen Embryonen auch im Darm. Durch die starke Fluoreszenz in diesen Geweben kommt es in der Lateralansicht zu erheblichem Streulicht. Außerdem erschweren es diese Fluoreszenzen, die Ausrichtung der Embryonen zu kontrollieren.

### **3.3 Die Rolle von Septate Junctions in der Entwicklung der Mittellinienglia**

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass im *Drosophila* Embryo Gliazellen spezielle Zellkontakte, so genannte pleated Septate Junctions (engl. pSJ), mit anderen Gliazellen und auch anderen Zelltypen bilden können (Carlson et al., 2000; Tepass and Hartenstein, 1994) Es gab Hinweise darauf, dass SJ-Marker in Mittellinienglia verstärkt exprimiert sind (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996). Im Weiteren sollten diese Hinweise überprüft werden und eine erste Untersuchung der Rolle von Septate Junctions in der Mittellinienglia Entwicklung vorgenommen werden.

#### **3.3.1 Die Expression von Discs large während der Mittellinienglia Entwicklung**

Bei Discs large (Dlg) handelt es sich um ein Membran assoziiertes MAGUK-Protein, das als Tumor Suppressor Gen fungiert und an der Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität beteiligt ist (siehe Einleitung). Es lokalisiert an Septate Junctions und ist an deren Bildung und Funktion beteiligt (Bilder et al., 2000; Woods and Bryant, 1991; Woods et al., 1997). Mit dem monoklonalen  $\alpha$ -Discs large Antikörper 4F3E3 wurde die Expression von Discs large während der Mittellinienglia Entwicklung untersucht. Discs large ist ubiquitär exprimiert und lokalisiert in den meisten Geweben an der gesamten Zellmembran (Abb. 37 A, D, G, J). In primären Epithelien wie Epidermis, Speicheldrüsen und Hinterdarm ist es in den hier besonders ausgeprägten Septate Junctions konzentriert (Abb. 37 G, Pfeil). Im ZNS ist Discs large in Mittellinienglia und in Neuronen von Beginn an gleichermaßen exprimiert. Es markiert anfangs die



**Abb. 37: Discs large Expression während der Entwicklung der Mittellinienglia.** Discs large (rot) ist während der gesamten Entwicklung ubiquitär exprimiert. Es markiert die Zellmembranen von Neuronen und Mittellinienglia (Pfeile in A&D) gleichermaßen. In späteren Stadien ist es stark in Axonen (Pfeilspitze in G&J) und den Mittellinienglia (Pfeile in I&L) exprimiert und scheint in deren umhüllenden Fortsätzen konzentriert (Pfeile in I und J). Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP dargestellt, Mittellinienglia mit *slitG>tauGFP*.

## Ergebnisse

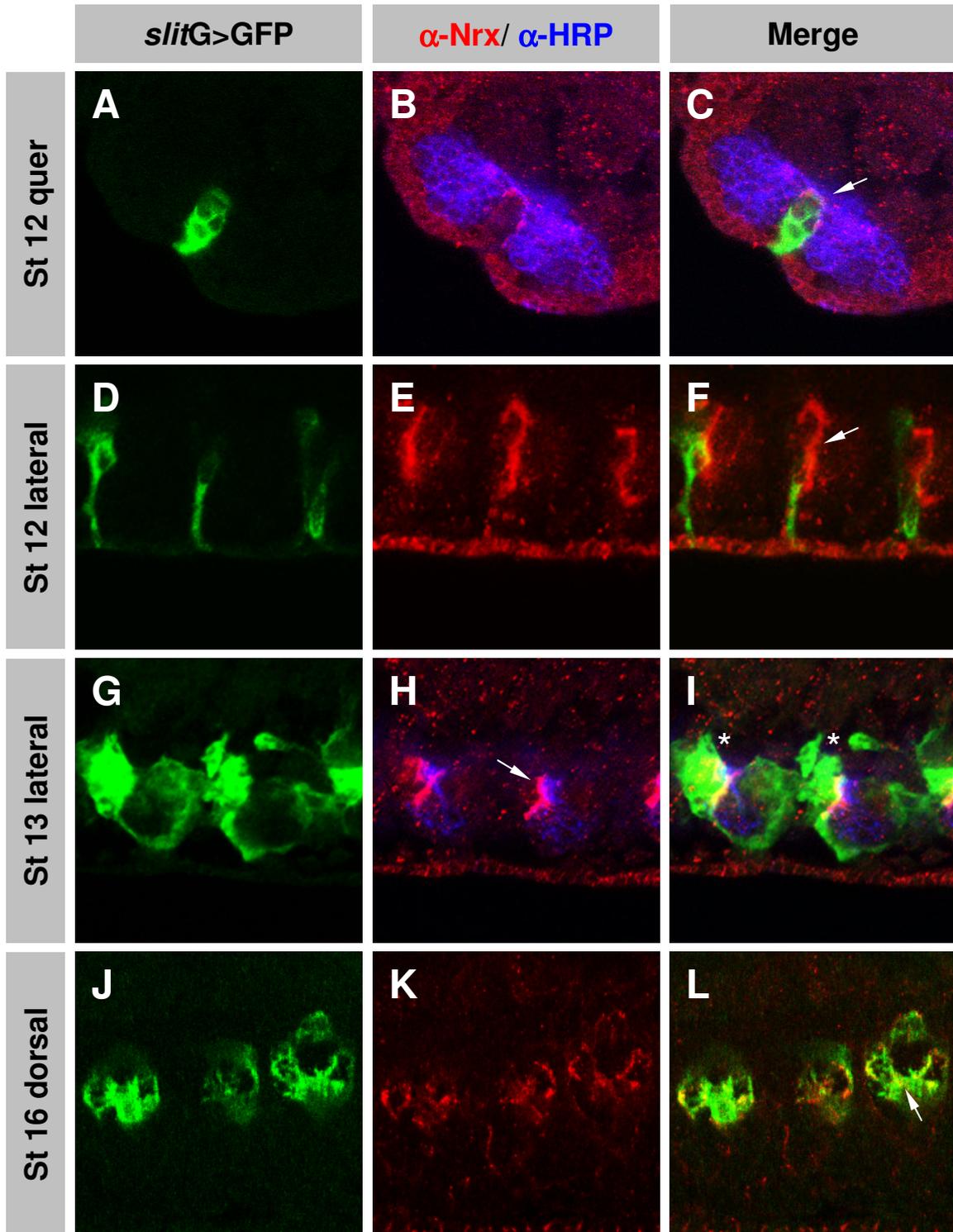
gesamten Zellmembran (Abb. 37 A und D, Pfeile) und ist nicht an besonderen Kontaktstellen konzentriert. In späteren Stadien zeigen die Axone (Abb. 37 G und J, Pfeilspitzen) und auch die Mittellinienglia (Abb. 37 Pfeile in I und L) ein starkes Discs lost Signal. Es scheint so, als sei Discs large besonders an den Kontaktstellen der umhüllenden Mittellinienglia mit den kommissuralen Axonen konzentriert (Abb. 37 Pfeile in I und J). Aufgrund der starken Expression in den Axonen ist dies aber schwierig zu beurteilen.

### **3.3.2 Die Expression von Neurexin IV während der Mittellinienglia Entwicklung**

Auch Neurexin IV (Neurexin, Nr<sub>x</sub>) ist in Septate Junctions exprimiert und ist für deren Funktion essentiell (Baumgartner et al., 1996). Mutationen in Neurexin führen neben der Zerstörung der Septate Junctions auch zu Defekten in der Blut-Hirn-Schranke. Das Transmembranprotein ist homolog zu humanem Caspr (Bhat, 2003; Peles et al., 1997), das eine wesentliche Rolle in der Interaktion von Schwanzzellen und Neuronen an den Paranodien der Ranvierschen Schnürringe (Bellen et al., 1998; Bhat, 2005; Bhat, 2003).

Auch Neurexin ist während der Entwicklung der Mittellinienglia exprimiert. Im Gegensatz zu Discs large scheint Neurexin aber deutlich distinkter zu lokalisieren (Abb. 38). Schon früh (Stadium 12) kann Neurexin an bestimmten Kontaktstellen zwischen den delaminierenden Mittellinienglia und den Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 38 C, F, H, Pfeile). Dieses Signal beobachtet man in frühen Stadien nur zwischen Neuronen und den Zellkörpern der anterioren Mittellinienglia (Abb. 38 Sterne in I). Die posterioren Mittellinienglia und die basalen Fortsätze der anterioren Mittellinienglia zeigen keine Neurexin Expression. In späteren Stadien findet sich Neurexin besonders in den umhüllenden Fortsätzen der Mittellinienglia (Abb. 38 Pfeil in L). Unter Umständen ist diese Expression zum Teil auch neuronal bedingt, dies lässt sich hier nicht sagen.

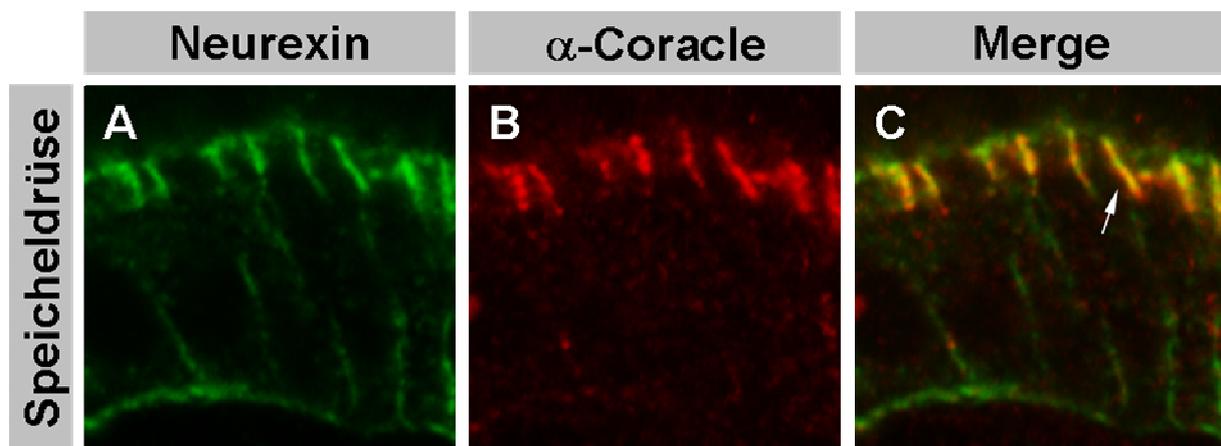
In unserem Labor konnte auch eine *neurexin* GFP-trap-Linie isoliert werden (Lammel und Grimm, persönliche Mitteilung; Peitz, 2005). Das GFP Signal der vitale Linie 454 (*neurexin*-GFP) zeigt eine typische Septate Junction Lokalisation in Epidermis, Speicheldrüsen (Abb. 39 C Pfeil), Hinterdarm und Tracheen und auch die typische Anreicherung in Mittellinienglia. Neben den Expressionen, die bereits über das Neurexin Antiserum charakterisiert wurden, konnte mittels der GFP-trap-Linie auch eine schwache neuronale Expression detektiert werden. Insgesamt schien der



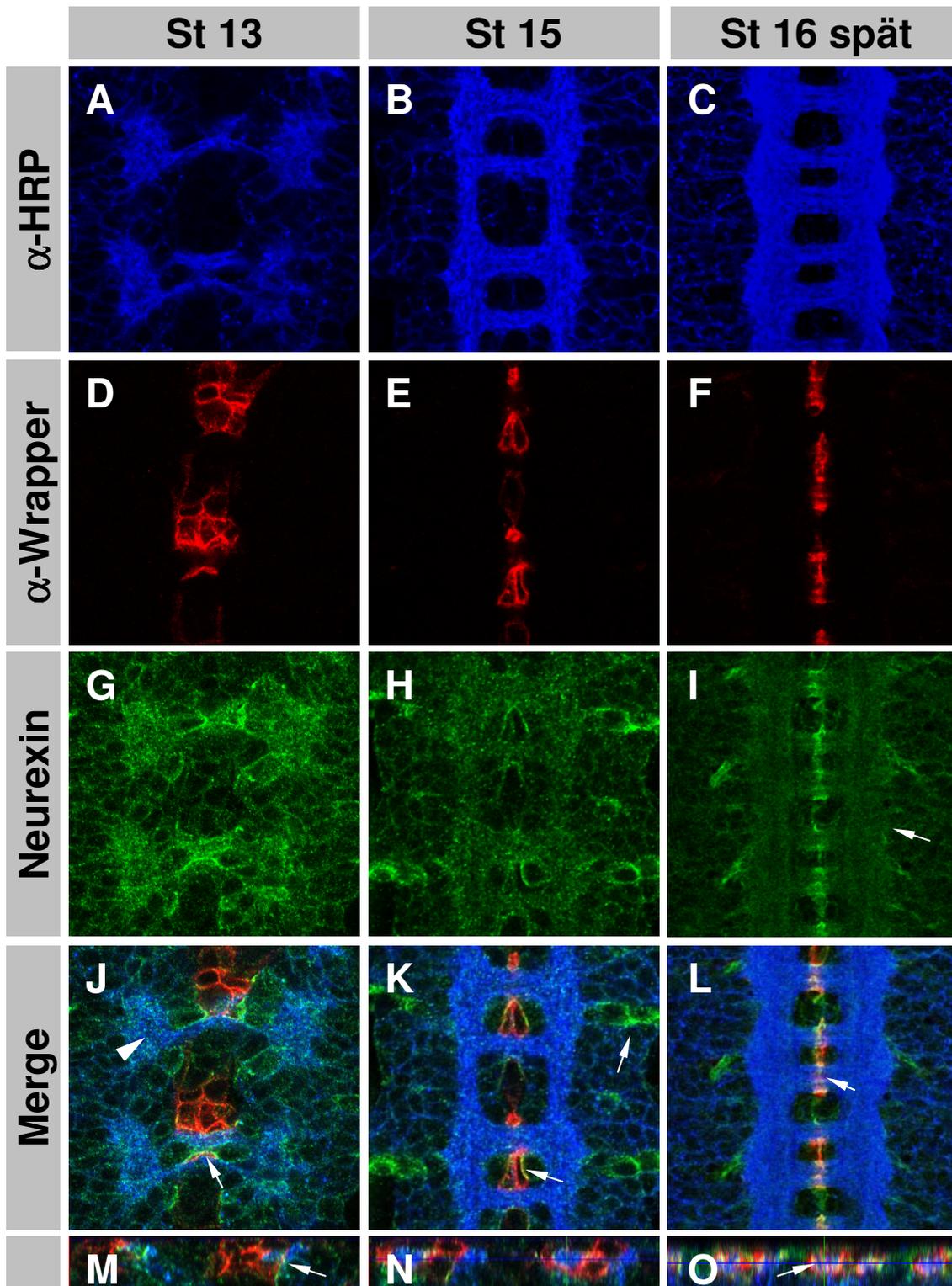
**Abb. 38: Neurexin IV Expression während der Entwicklung der Mittellinienglia.** Embryonen verschiedener Stadien wurden untersucht. Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP dargestellt (blau), Mittellinienglia mit *slitG>tauGFP* (grün). (A-C) Querschnitt. (D-L) Lateralansichten. Neurexin Expression (Nrx, rot) zeigt sich schon früh in der Entwicklung an speziellen Kontaktstellen der Mittellinienglia mit Neuronen (Pfeile in C, F, H). Vor allem die anterioren Mittellinienglia (Sterne, I) zeigen im Bereich ihrer Zellkörper Neurexin Expression (H, Pfeil), während die Fortsätze kein Signal zeigen. In späten Stadien ist Neurexin stark in den Axon umhüllenden Fortsätzen der Mittellinienglia exprimiert (Pfeil in L).

## Ergebnisse

Nachweis über die Expression des Neurexin-GFP Fusionsproteins deutlich sensitiver, als der Nachweis über das Antiserum. In Abbildung 40 ist die Neurexin-GFP Expression während der Mittellinienglia Entwicklung dargestellt. Die Mittellinienglia sind mit  $\alpha$ -Wrapper markiert, die Neurone mit  $\alpha$ -HRP. Es konnte beobachtet werden, dass im frühen Stadium 13 die Mittellinienglia in engem Kontakt mit den Kommissuren getreten sind. Die Gliazellen sind bereits zwischen anteriore und posteriore Kommissur interkaliert (Abb. 40 J und M Pfeile). An diesen Kontaktstellen ist Neurexin besonders konzentriert, allerdings findet sich hier auch Expression in Neuronen (Abb. 40 J Pfeilspitze). Im Stadium 15 zeigt sich dann eine Konzentration in Mittellinienglia und lateralen Glia (Abb. 40 K, Pfeile). Das Umhüllen der kommissuralen Axone durch die Mittellinienglia ist noch nicht weit fortgeschritten. Zwar ist die anteriore Kommissur hier zum Teil schon umhüllt, aber die posteriore Kommissur ist noch frei und auch die Faszikel der anterioren Kommissur sind noch nicht unterteilt (Abb. 40 K und N). Im späten Stadium 16 ist dieser Prozess offenbar weitgehend abgeschlossen. Die Mittellinienglia umhüllen beide Kommissuren und deren Axone (Abb. 40 L und O). Neurexin-GFP kolokalisiert hier zusammen mit Wrapper in den umhüllenden Fortsätzen der Mittellinienglia. Daneben ist Neurexin noch in den Neuropilglia exprimiert (Abb. 40 Pfeil in I), fehlt aber in den Axonen weitgehend. Die neuronalen Zellkörper scheinen Neurexin schwach zu exprimieren, wobei hier unklar ist, ob diese Expression nicht auch durch Glia, welche die Neurone umgeben, verursacht sein kann (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 39: Neurexin und Coracle lokalisieren in pSJ.** Speicheldrüsenzellen eines 454 (Nrx-GFP) Embryos im Stadium 16. Coracle und Neurexin-GFP kolokalisieren in pleated Septate Junctions (Pfeil, C). Neurexin-GFP zeigt zusätzlich eine schwache Expression an der basolateralen und apikalen Zellmembran.



**Abb. 40: Neurexin IV Expression während der Entwicklung der Mittellinienglia II.** ZNS Präparationen von *neurexin*-GFP Embryonen verschiedener Stadien. Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP dargestellt, die Mittellinienglia mit  $\alpha$ -Wrapper, GFP wurde über einen  $\alpha$ -GFP pAb nachgewiesen. (A-L) Einzelschnitte, anterior oben; (M-O) Orthogonalansichten der Z-Stapel, anterior ist links, die Schnittebene liegt median. Neurexin-GFP ist an Kontaktstellen von Mittellinienglia mit Neuronen konzentriert (J; M; Pfeil). Spät ist Neurexin in den umhüllenden Fortsätzen der Mittellinienglia konzentriert (L und O, Pfeil). Details siehe Text.

### 3.3.3 Die Expression von Coracle während der Mittellinienglia Entwicklung

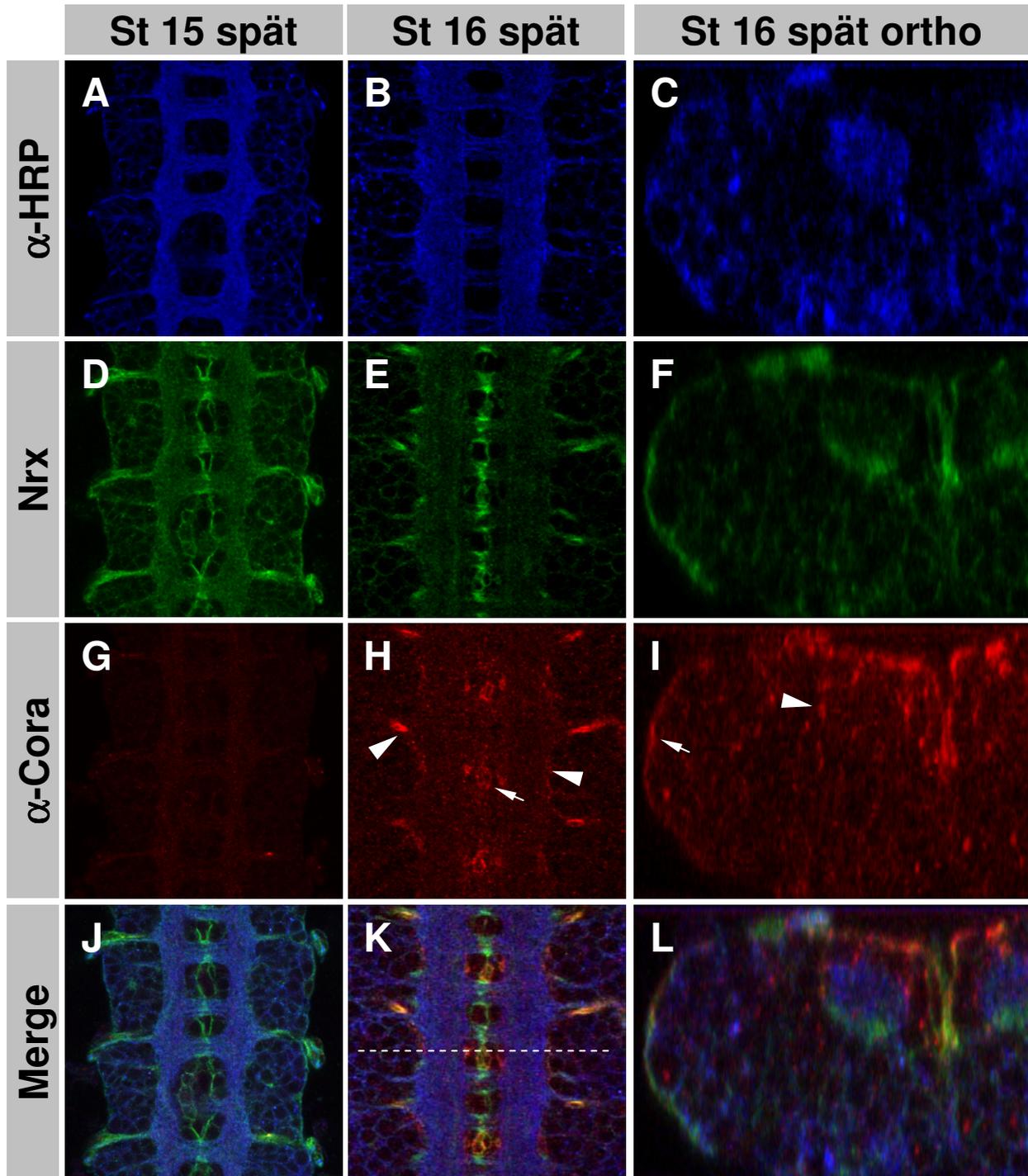
Auch bei Coracle (Cora) handelt es sich um ein Protein, das in Septate Junctions lokalisiert ist (Abb. 39 B) und für deren Bildung und deren korrekte Funktion als parazelluläre Diffusionsbarriere benötigt wird (Fehon et al., 1994; Ward et al., 1998). Es handelt sich um ein Bande 4.1 Protein Homolog und ist damit ein potentieller Interaktionspartner des Spectrin Heterotetramers.

Das Coracle-Protein lässt sich mit dem verwendeten Antiserum erst in späten Stadien im ZNS nachweisen. Im Stadium 14 beobachtet man z.B. in der Epidermis ein kräftiges Coracle Signal an den SJ, im ZNS findet sich aber erst ab Stadium 16 eine Expression (Abb. 41 vgl. G und H). Coracle markiert wie Neurexin-GFP schwach die Neuropilglia (Abb. 41 K) und in der Mittellinie die Channelglia (engl.) (Abb. 41 H). Es findet sich allerdings keine Überlappung der Signale im Bereich der Mittellinienglia. In den Axon umhüllenden Bereiche der Mittellinienglia, die durch Neurexin-GFP stark markiert sind, ist kein Coracle Signal zu detektieren. Coracle und Neurexin kolokalisieren aber an der äußeren Grenze des ZNS. Bei dieser Expression handelt es sich wahrscheinlich um Subperineurialglia. Für Coracle fällt auf, dass es an der dorsalen Oberfläche des ZNS deutlich stärker exprimiert ist, als in den lateralen Bereichen (Abb. 41 I).

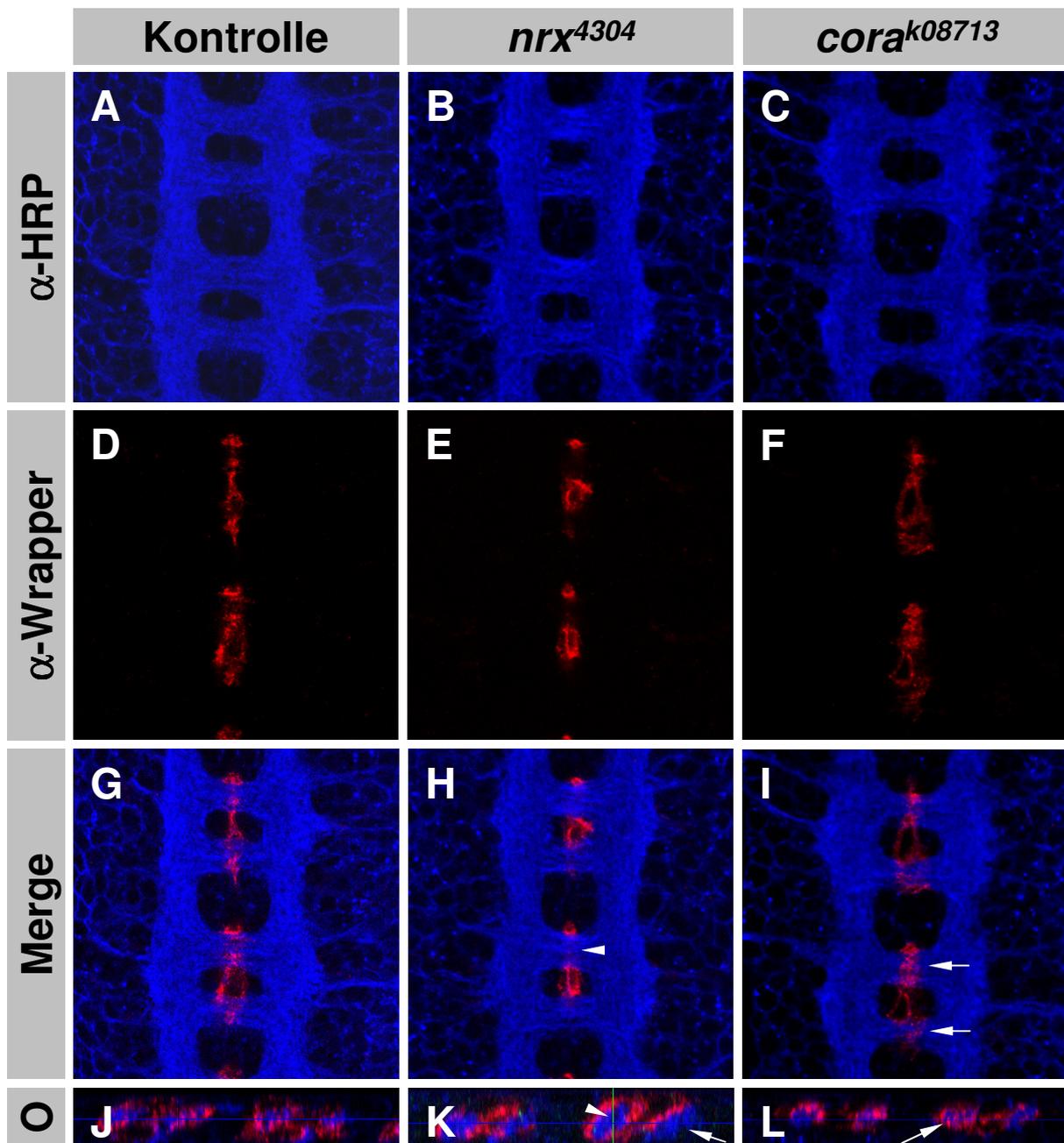
### 3.3.4 *neurexin*<sup>4304</sup> Mutanten zeigen ein unvollständiges Umhüllen der Kommissuren

Nach der Analyse der Expressionsmuster der Proteine Discs large, Neurexin, und Coracle sollten Mutanten der jeweiligen Gene analysiert werden. Dies wurde für Neurexin und Coracle durchgeführt, da zygotische Mutanten erhältlich sind, die embryonal letal sind, ohne die Entwicklung des Embryos fundamental zu stören und sich so für eine Analyse der Mittellinienglia Funktion eignen. Es wurden die stark hypomorphen Mutationen *nrx*<sup>4304</sup> und *cora*<sup>P[k08713]</sup> auf eventuelle Defekte in der Mittellinienglia Entwicklung mit Hilfe eines  $\alpha$ -Wrapper Antiserums untersucht (Noordermeer et al., 1998).

Es konnten für *coracle* Mutanten keinerlei Defekte in der Entwicklung der Mittellinienglia nachgewiesen werden. Die Mittellinienglia delaminierten, trennten die Kommissuren normal und umhüllten schließlich sowohl anteriore als auch posteriore Kommissur (Abb. 42 I und L). Auch fand die Umhüllung der Faszikel in den Kommissuren normal statt (Abb. 42 I und L Pfeile).



**Abb. 41: Coracle Expression während der Entwicklung der Mittellinienglia.** ZNS Präparationen von *neurexin*-GFP Embryonen verschiedener Stadien. Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP dargestellt (blau), GFP wurde über einen  $\alpha$ -GFP pAb nachgewiesen (grün). (A-L) zeigen Einzelschnitte, anterior ist oben; (C, F, I, L) Orthogonalansichten des Z-Stapels, dorsal ist oben; Linie in K gibt in etwa die Schnittebene an. Coracle (rot) ist erst ab Stadium 16 exprimiert und lokalisiert nicht in Mittellinienglia, sondern in Channelglia (H, Pfeil), Neuropilglia (H&I, Pfeilspitzen) und Subperineuralglia (I, Pfeil). (Detail siehe Text).



**Abb. 42: Die *nrx<sup>4304</sup>* Mutante zeigt Defekte in der Umhüllung von kommissuralen Axonen.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP dargestellt, Mittellinienglia mit  $\alpha$ -Wrapper. (A-I) Einzelschnitte, anterior ist oben; (J-L) Orthogonalansichten der Z-Stapel, anterior links. In *nrx<sup>4304</sup>* Tieren ist die posteriore Kommissur unvollständig von Mittellinienglia umhüllt. (K, Pfeil), und auch im Inneren der anterioren Kommissur findet keine Umhüllung der Axone statt (H und K, Pfeilspitze). Die *coracle* Mutante zeigt keine Defekte in den Mittellinienglia (Pfeile in I und L).

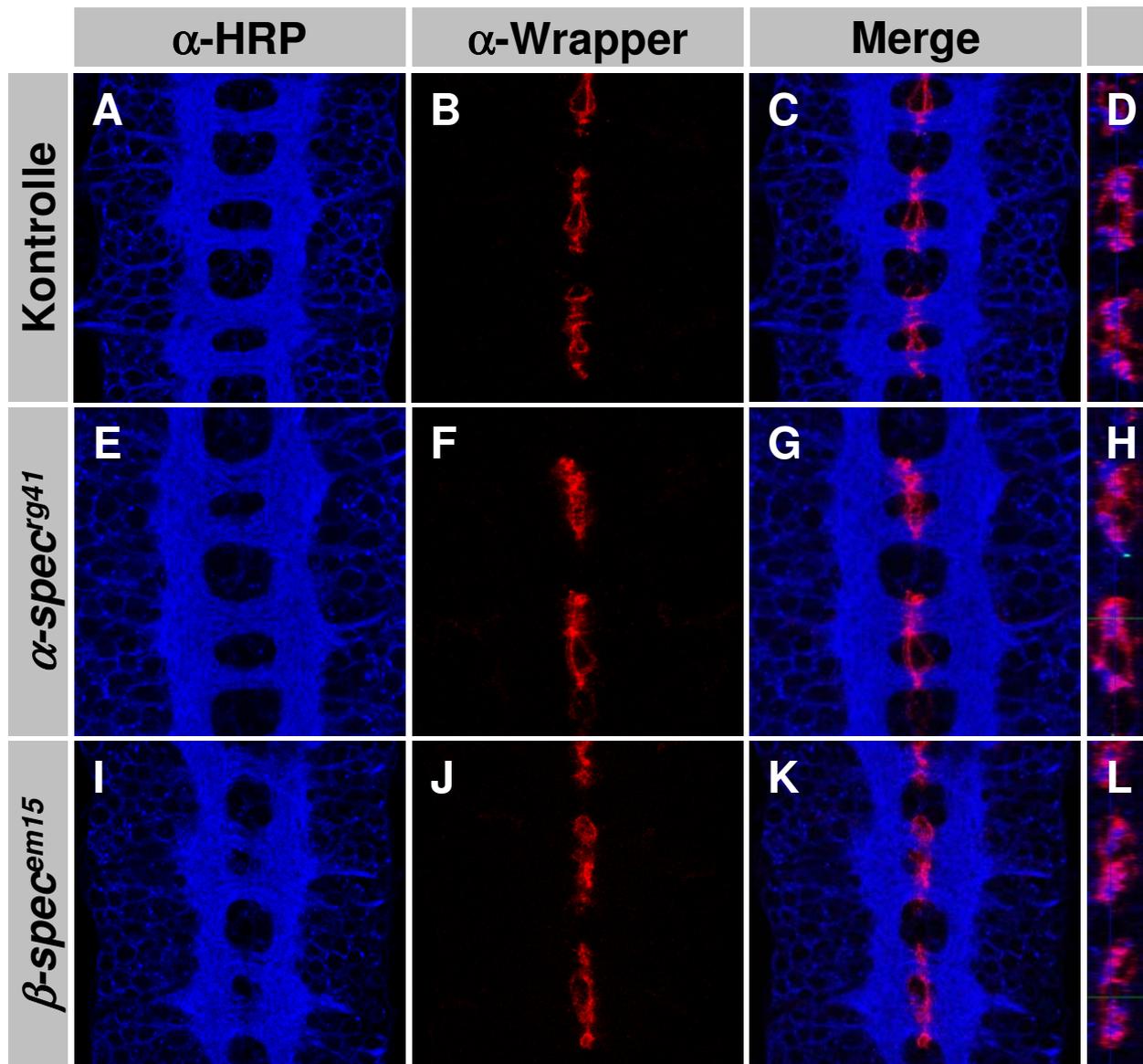
## Ergebnisse

Dies war in der *neurexin*<sup>4304</sup> Mutante nicht der Fall. Zwar war die frühe Entwicklung der Mittellinienglia nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt), jedoch kam es in der terminalen Differenzierung zu deutlichen Defekten. Im Stadium 16 ist in der *neurexin* Mutante die anteriore Kommissur von Mittellinienglia umgeben, die posteriore Kommissur ist in der Regel aber nur teilweise bedeckt (Abb. 42 K Pfeil). Auffällig ist weiter, dass die anteriore Kommissur zwar von Mittellinienglia umgeben war, es aber im Inneren nie zu einer Umhüllung der Axone und zur Faszikelbildung kam (Abb. 42 K, Pfeilspitze). Die Mittellinienglia sind offenbar nicht in der Lage, entsprechende umhüllende Ausläufer zu bilden, bzw. diese Ausläufer zu stabilisieren. Der Differenzierungsgrad der Mittellinienglia im Stadium 16 in der *nrx* Mutante entspricht in etwa dem des Wildtyps im frühen Stadium 15 (siehe Abb. 40 N). Es scheint hier zu einem Entwicklungsstopp in der Differenzierung zu kommen. In sehr späten embryonalen Stadien (frühes Stadium 17) kommt es in *neurexin* mutanten Tieren zu einer deutlichen Abnahme des Wrapper Signals (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.5 Rolle des Spectrin Cytoskeletts in der terminalen Differenzierung der Mittellinienglia**

Ursprünglich wurde in dieser Arbeit die Aufmerksamkeit auf Neurexin und Coracle gelenkt, weil beide Proteine als potentielle, indirekte Interaktionspartner Spectrins gelten (Bennett and Baines, 2001; Dubreuil and Grushko, 1999; Dubreuil et al., 1996). Auch das L1-CAM Neuroglian und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sind als zumindest indirekte Interaktionspartner Spectrins bekannt (Dubreuil and Grushko, 1999; Dubreuil et al., 1996; Ward et al., 1998).

Für die vier Proteine konnte gezeigt werden, dass sie in pleated Septate Junctions lokalisieren und auch für deren Assemblierung und Funktion essentiell sind (Baumgartner et al., 1996; Genova and Fehon, 2003; Lamb et al., 1998; Ward et al., 1998). Damit lag es nahe einen möglichen Effekt des Spectrin Cytoskeletts auf Septate Junctions zu untersuchen. Dazu wurde überprüft, ob Mutationen in *spectrin* zu Defekten in der terminalen Differenzierung der Mittellinienglia führen können. Es wurden sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -*spectrin* Mutanten mittels des Wrapper Antikörpers auf Mittellinienglia Defekte untersucht. Für beide Spectrine konnten dabei allerdings keine Defekte in der Umhüllung der Axone gezeigt werden. In  $\alpha$ -*spectrin*<sup>g41</sup> fand sich weder im Axonmuster noch in den Mittellinienglia ein abnormer Phänotyp (Abb. 43 E-H). Die  $\beta$ -*spectrin* Mutante hatte zwar Defekte im axonalen Muster (siehe auch



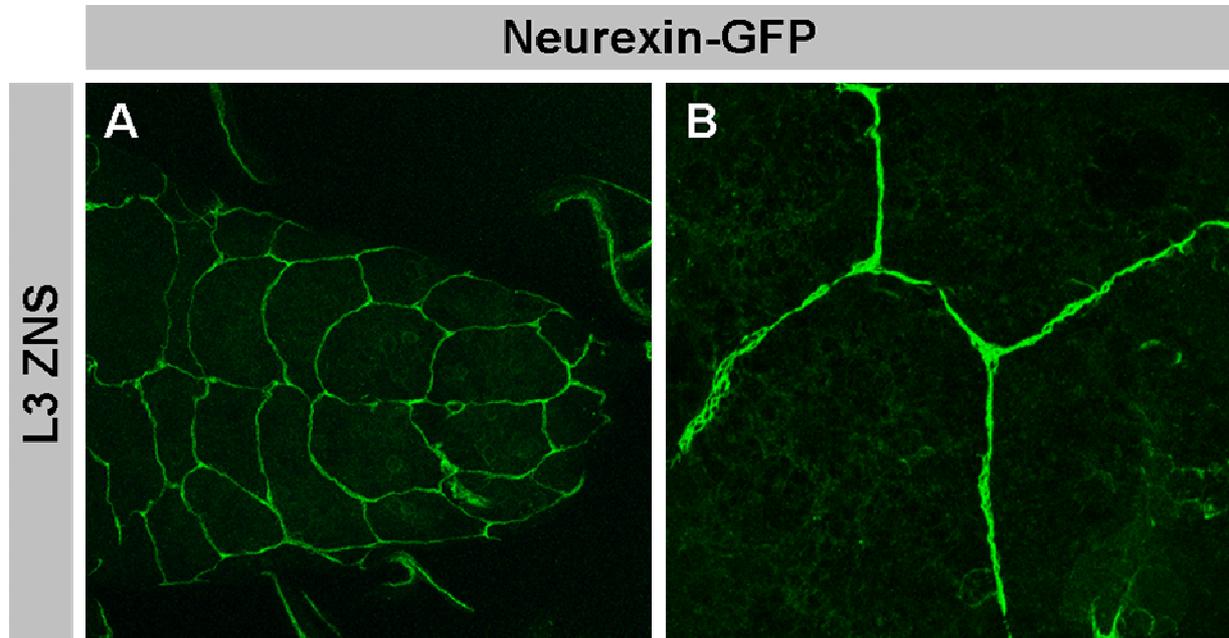
**Abb. 43:  $\alpha$ - und  $\beta$ -spectrin Mutanten zeigen keine Defekte in der Umhüllung von Axonen.** ZNS Präparationen von Stadium 16 Embryonen. Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP dargestellt, Mittellinienglia mit  $\alpha$ -Wrapper. (A-C, E-G, I-K) Einzelschnitte, anterior ist oben; (D, H, L) Orthogonalansichten der Z-Stapel, anterior oben. Weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -spectrin Mutanten zeigen Defekte in der terminalen Differenzierung der Mittellinienglia.

## Ergebnisse

Abschnitt 3.1.4.12), die Mittellinienglia umhüllten die Axone in den Kommissuren jedoch normal (Abb. 43 I-L). Es konnte hier also kein Effekt des Spectrin Cytoskeletts auf die terminale Differenzierung der Mittellinienglia oder auf Septate Junctions nachgewiesen werden.

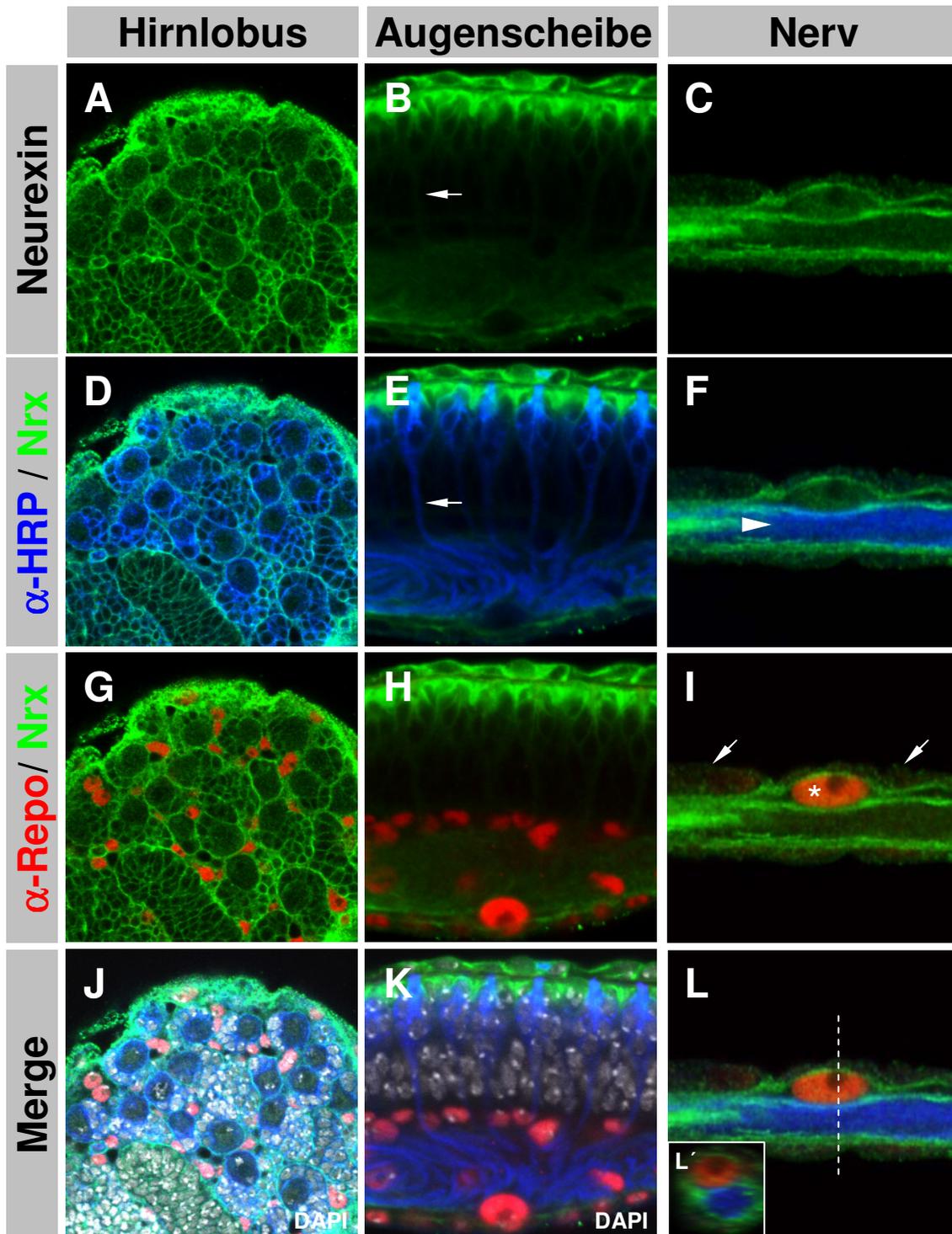
### 3.3.6 Septate Junctions und die Blut-Hirn-Schranke

In *neurexin* Mutanten ist die so genannte Blut-Hirn-Schranke defekt (Baumgartner et al., 1996). Dies wurde auf die Zerstörung der Septate Junctions zurückgeführt. Welche Zellen nun die Blut-Hirn-Schranke tatsächlich bilden, wird kontrovers diskutiert (Carlson and Hilgers, 1998; Edwards et al., 1993). So könnten z.B. die Perineurialzellen die Funktion einer Diffusionsbarriere einnehmen. Diese Zellen sind extrem groß und flach und sie bedecken in einer einzelligen Schicht das gesamte ZNS und periphere Nerven und werden erst sehr spät in der Embryogenese sichtbar (Carlson et al., 2000; Schwabe et al., 2005). An ihren Kontaktstellen ist Neurexin exprimiert (Abb. 44 A und B) und sie sind durch Septate Junctions verbunden (Carlson and Hilgers, 1998).



**Abb. 44: Perineurium der L3 Larve.** Neurexin-GFP Expression markiert das Perineurium. (A) Bauchmark, (B) Detail Hirnloben. Die extrem großen und flachen Zellen des Perineuriums bedecken Bauchmark und Hirnloben.

Neurexin ist aber auch in anderen Gliazellen exprimiert, so dass es möglich ist, dass diese die Blut-Hirn-Schranke bilden. Daher wurde das Expressionsmuster der



**Abb. 45: Larvale Expression von Neurexin-GFP.** Expression des Neurexin-GFP im dritten Larvenstadium. Einzelne konfokale Schnitte von Hirnlobus, Augenscheibe (quer) und eines abdominalen Nervs des Bauchmarks (längs). Neurone sind mit  $\alpha$ -HRP (blau), Gliazellkerne mit  $\alpha$ -Repo (rot), Neurexin mit  $\alpha$ -GFP (grün) und alle Zellkerne mit DAPI (weiß) dargestellt. Neurexin ist in neuronalen Membranen ohne Gliakontakt nur schwach exprimiert (B, E, F). Im abdominalen Nerv zeigt sich Neurexin Expression an den Grenzflächen von Glia mit umgebenden Gewebe. (I, Stern) Gliazellkern. (L') Orthogonalansicht von (L), die Linie zeigt die ungefähre Lage des Querschnitts. (F, Pfeilspitze) Nerv; (I, Pfeile) Perineurium.

## Ergebnisse

*neurexin*-GFP Exon-trap Linie in der L3 Larve detaillierter untersucht (Abb. 44 und Abb. 45). Neben der Expression in Perineurialzellen (Abb. 44) zeigt die *neurexin*-GFP Linie im Hirnlobus eine fast ubiquitäre Expression, so dass hier nicht zwischen glialer und neuronaler Expression unterschieden werden konnte (Abb. 45 A, D, G, J). Es scheint aber so, dass beide Zelltypen Neurexin exprimieren. In der Augenscheibe sind die Zellkörper und die Axone der Photorezeptorzellen im proximalen Teil nicht in Kontakt mit Gliazellen (Hummel et al., 2002). In diesem Teil der Axone konnte nur eine sehr schwache Neurexin Expression festgestellt werden (Abb. 45 B und E, Pfeil). In einem Längsschnitt eines abdominalen Nervs fand sich Neurexin Expression an den Zellgrenzen der umhüllenden Gliazelle (Abb. 45 C, F, I, L). Der Zellkern der Gliazelle (Abb. 45 Stern in I) ist mit einem  $\alpha$ -Repo mAb markiert. Zwischen Gliazelle und Nerv (Abb. 45 F, Pfeilspitze) zeigt sich Neurexin-GFP Signal. Um die Gliazelle herum befindet sich eine weitere Zellschicht (Abb. 45 I, Pfeile), deren Identität bisher nicht geklärt ist. Es könnte sich aber um Perineurialzellen handeln. In jedem Fall kann auch an dieser Grenzschicht Neurexin Expression detektiert werden. Es kann hier nicht gesagt werden, ob die Expression glial, axonal, perineurial ist oder eventuell in allen Zelltypen auftritt.

### 3.3.7 Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke

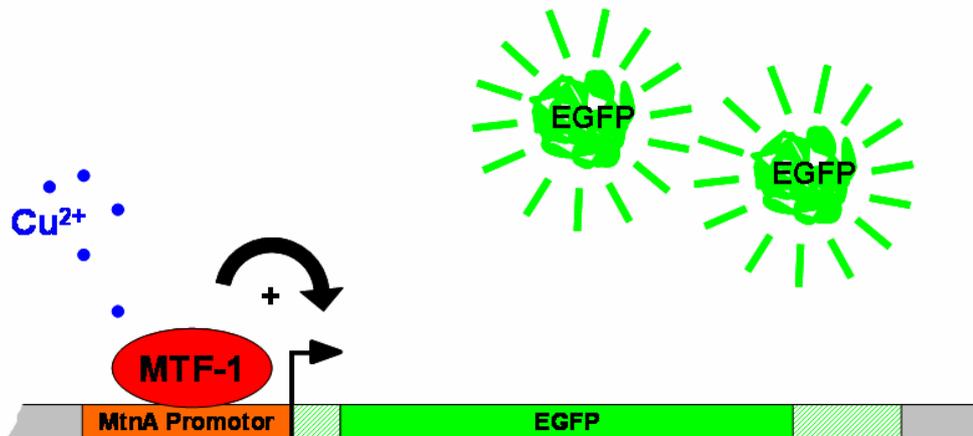
Um die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke direkt zu testen, gibt es zurzeit nur die Möglichkeit, neuronale Ableitungen vorzunehmen (Baumgartner et al., 1996, Auld et al., 1995). Dies ist in *Drosophila* Embryonen und Larven technisch anspruchsvoll und nur mit viel Aufwand zu bewerkstelligen. Um dies zu umgehen, sollten im Rahmen dieser Arbeit erste Tests zur Entwicklung einer einfachen Methode, mit der sich die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke testen ließe, durchgeführt werden.

Da die Blut-Hirn-Schranke für Schwermetallionen wie Cadmium oder Kupfer nicht durchlässig ist (Carlson et al., 2000; Juang and Carlson, 1994), sollte versucht werden, einen Schwermetalsensor als Reporter für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke einzusetzen. In *Drosophila* ist gezeigt worden, dass sich der Metallothionein A Promotor (*mtnA*) durch Schwermetallionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen induzieren lässt. Der Promotor wird in der Zellkultur von *Drosophila* S2 Zellen bereits als induzierbarer Promotor eingesetzt (Invitrogen, (Bunch et al., 1988)).

Es wurde versucht, den *mtnA* Promotor als Schwermetallsensor in Neuronen des ZNS einzusetzen und so die Integrität der Blut-Hirn-Schranke zu überprüfen. Bei

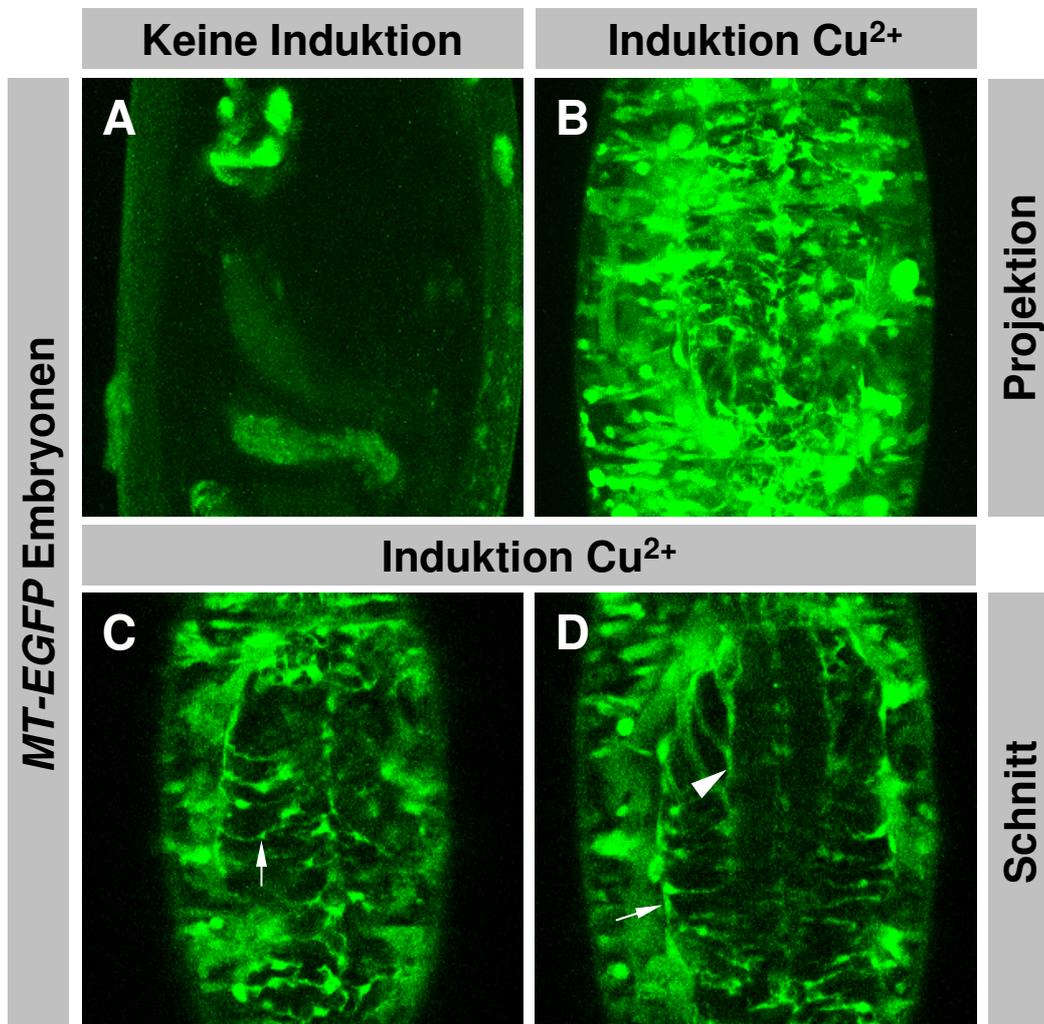
## Ergebnisse

Injektion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in die Hämolymphe sollte dieser Sensor im ZNS nur ein Signal geben, wenn die Blut-Hirn-Schranke nicht intakt ist.



**Abb. 46: Schema der Funktionsweise des MT-EGFP Reporterkonstruktes.** Expression vom *mtnA* Promotor ist in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor MTF-1 durch Kupferionen induzierbar. Erfolgreiche Induktion kann durch GFP Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Der *mtnA* Promotor wurde vor ein cytoplasmatisches EGFP (Clontech) kloniert (Abb. 46). Dieses Reporterkonstrukt (MT-EGFP) wurde in den P-Element basierten Transformationsvektor pCaSpeR4 gebracht und in Zellkultur getestet. Dazu wurden *Drosophila* S2 Zellen mit dem Vektor transfiziert und schließlich die EGFP Expression durch die Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  induziert. In nicht induzierten Kontrollzellen zeigten kein Signal (Daten nicht gezeigt). In den induzierten Zellen konnte nach 24 Stunden eine deutliche GFP Fluoreszenz in transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da das Konstrukt offensichtlich funktionsfähig war, wurden Fliegen transformiert. Es wurden unabhängige Insertionen für das erste, zweite und dritte Chromosom erhalten. In den Linien zeigte sich bereits auf dem Standardfutter eine grüne Fluoreszenz in den Larven. Diese Expression war in verschiedenen Darmabschnitten, in den malphigischen Gefäßen und in wahrscheinlich sensorischen Organen am Kopf zu beobachten. In einzelnen Linien mit besonders starker Expression, konnte teilweise noch eine Fluoreszenz in einigen Gliazellen des ZNS, in manchen Muskeln und in den Speicheldrüsen gefunden werden. Die Expression ohne explizite Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  könnte zum einen auf eine basale Aktivität des *mtnA* Promotors zurückzuführen sein (Bonneton et al., 1996) oder unter Umständen durch die Kupfer-Konzentration im Futter ausgelöst worden sein.



**Abb. 47: Induktion der Expression des MT-EGFP Reporter Konstruktes.** Homozygote MT-EGFP<sup>10-3</sup> transgene Embryonen im Stadium 17. (A) ohne Injektion und mit (B-D) Injektion von CuSO<sub>4</sub> 5h nach der Behandlung. Durch CuSO<sub>4</sub> lässt sich in vielen Geweben eine starke GFP Expression induzieren. Im ZNS zeigen Neuropilglia (D, Pfeilspitze) und Subperineuralglia (C und D, Pfeil) eine Induktion, die Neurone jedoch nicht.

## Ergebnisse

Durch Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  (Endkonzentration ca. 100mM) ins Futter konnte in den Larven die Fluoreszenz deutlich verstärkt werden (Daten nicht gezeigt). Dabei verstärkte sich die Expression in den oben beschriebenen Geweben, ohne dass in anderen Geweben wie z.B. Neuronen oder der Epidermis GFP-Signal induziert wurde.

Für die homozygot vitale Linie MT-EGFP 10-3 wurde eine genauere Analyse vorgenommen. Dazu wurde in Stadium 17 Embryonen eine 50mM  $\text{CuSO}_4$  Lösung injiziert und die Entwicklung der Fluoreszenz über mehrere Stunden kontrolliert. In unbehandelten oder mit PBS injizierten Embryonen zeigte sich nach 5 Stunden eine basale GFP Fluoreszenz in Darmabschnitten und im anterioren Bereich der malphigischen Gefäße (Abb. 47 A). In den mit  $\text{CuSO}_4$  injizierten Tiere trat jedoch eine sehr starke Fluoreszenz in vielen Geweben auf. Neben Darm und malphigischen Gefäßen zeigten vor allem Muskeln, Speicheldrüsen und Hämocyten eine sehr starke Induktion des GFP-Signals. Im ZNS kam es zu einer Induktion in einigen Gliazellen, während die Neurone kein Signal zeigten. Bei den Gliazellen handelt es sich vor allem um Subperineurialglia (Abb. 47 C und D, Pfeil) und Neuropilglia (Abb. 47 D, Pfeilspitze). In der Epidermis konnte keine Induktion detektiert werden.

Weitere Versuche mit Mutanten in denen die Blut-Hirn-Schranke aufgelöst ist (*neurexin*, *glial cells missing*, *loco*) müssen zeigen, ob das MT-EGFP Reporterkonstrukt sich auch in Neuronen induzieren lässt.

## 4. Diskussion

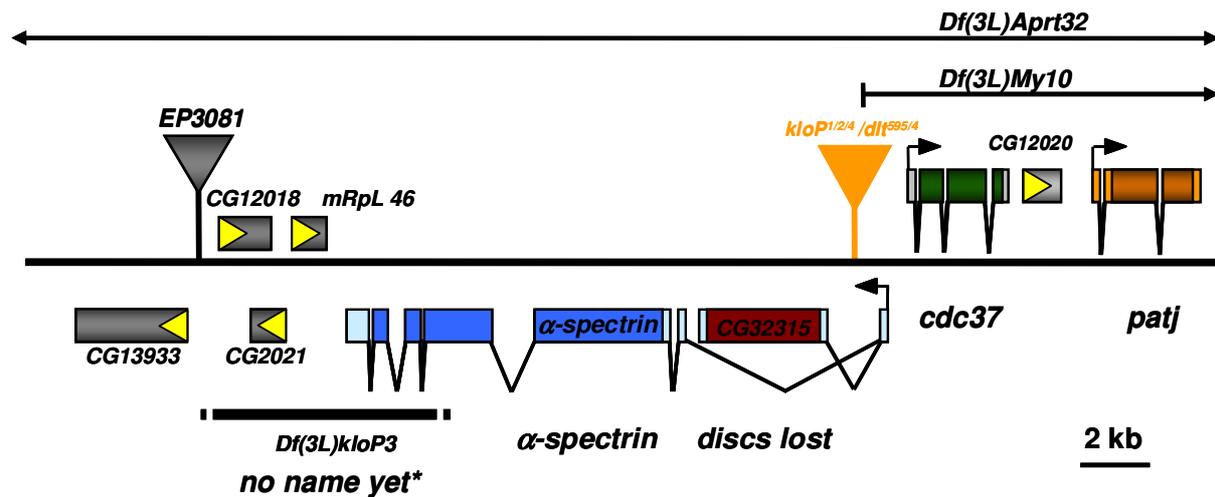
In der Vergangenheit gab es Hinweise darauf, dass das Gen *klötzchen* für die polare Differenzierung der Mittellinienglia essentiell sei (Hummel et al., 1999a; Hummel et al., 1999b; Pielage, 2002). Die *klötzchen* Mutationen wurden in die genomische Region 62B3-4 kartiert, konnten allerdings bisher nicht eindeutig einem Genort zugeordnet werden (Pielage, 2002). Als Kandidatengene für *klötzchen* galten  $\alpha$ -spectrin und vor allem CG32315. Für dieses Gen, das sich das erste nicht translatierte Exon mit  $\alpha$ -spectrin teilt und in dessen ersten Intron liegt, wurde eine Funktion als potentieller  $\alpha$ -spectrin Regulator vermutet (Pielage, 2002). In jedem Fall wurde der beobachtete Phänotyp mit dem Verlust des  $\alpha$ -Spectrin Proteins in Zusammenhang gebracht (Pielage, 2002).

Durch die verschachtelte genomische Situation und die Beschreibung von zusätzlichen cis-regulatorischen Sequenzen, die einen Einfluss auf das proximal gelegene Gen *patj* haben sollten, wurden komplexe, genetische Beziehungen in dieser Region angenommen (Bhat et al., 1999; Pielage, 2002; Stork, 2002).

In dieser Arbeit konnten die genetischen Zusammenhänge der  $\alpha$ -spectrin/CG32315 Region mit Hilfe einer EMS Mutagenese und weiteren Analysen weitgehend aufgeklärt werden.

### 4.1 Die EMS Mutagenese

Durch die EMS Mutagenese über die P-Elemente *P[kloP1]*, *P[kloP2]*, *P[kloP3]* und *P[kloP4]* und das  $\alpha$ -spectrin Allel *rg41* wurden drei Komplementationsgruppen aufgedeckt. Aus 12000 Einzelkreuzungen wurden für  $\alpha$ -spectrin 22 neue Allele, für *discs lost 4* neue Allele und für *no name yet* ebenfalls 4 Allele generiert. Die Allele *P-1* und *V-4* konnten in keine der drei Komplementationsgruppen eingeordnet werden. Im Weiteren werden die Ergebnisse der drei Komplementationsgruppen  $\alpha$ -spectrin, *discs lost* und *no name yet* diskutiert. Zur besseren Orientierung ist die genomische Situation in Abb. D1 schematisch dargestellt.



**Abb. D1: Die genomische Region des  $\alpha$ -spectrin/discs lost Lokus bei 62B3-4.** Die Lage der verschiedenen Gene in der Region sind durch Kästen angedeutet. Die Dreiecke symbolisieren P-Element Insertionen. Die Pfeile an den Genen zeigen die Transkriptionsrichtung an. Die deletierten Regionen für die Defizienzen *Df(3L)My10* und *Df(3L)Aprt32* sind durch schwarze Pfeile markiert. Bei den CG Genen handelt es sich um vom Computer vorgenommene Annotationen (Computer Generated genes, engl.). Details siehe Text.

#### 4.1.1 *no name yet*

Die Komplementationsgruppe *no name yet* (*nny*) wurde in der EMS Mutagenese über die *klötzchen* P-Elemente aufgedeckt. Bei *P[kloP1]*, *P[kloP2]* und *P[kloP4]* handelt es sich um Insertionen im ersten Intron von  $\alpha$ -spectrin/CG32315. Sie wurden alle durch einen „local hop“ Ansatz von der ca. 10kb distal liegenden Insertion *P[EP3081]* erzeugt. Da die unabhängige Insertion *P[discs lost<sup>595/4</sup>]* ebenfalls im ersten Intron in direkter Nähe zu den *P[kloP1/2/4]* Insertionen liegt, aber die *no name yet* Allele komplementiert, ist davon auszugehen, dass es in den *klötzchen* P-Elementen bei der Mobilisierung von *P[EP3081]* zu Mutationen gekommen ist. Für *P[kloP3]* konnte durch PCR Analyse (Pielage, 2002) und Southern Blot Analyse gezeigt werden, dass es sich um eine Defizienz handelt, deren linker Bruchpunkt in *P[EP3081]* und deren rechter Bruchpunkt im 4. Exon von  $\alpha$ -spectrin liegt (Abb. D1). Diese Defizienz komplementiert ebenfalls die *no name yet* Allele nicht, so dass es wahrscheinlich ist, dass *no name yet* durch ein Gen in diesem Bereich kodiert wird. Die Kandidatengene *CG12018*, *CG2021* und *mRp L46* scheinen alle eine Funktion in sehr basalen Zellprozessen zu haben. Sie kodieren eine Komponente des kleinen nukleären Ribonukleoprotein Komplexes U6, eine Untereinheit einer DNA

## Diskussion

Polymerase und ein ribosomales Protein. Die *no name yet* Mutanten zeigen eine früh pupale Letalität, die mit dem weitgehenden Fehlen von Imaginalscheiben verbunden ist (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich um einen häufig beobachteter Phänotyp in *Drosophila* (Cohen, 1993; Lindsley and Zimm, 1992; Shearn and Garen, 1974; Shearn et al., 1971; Szabad and Bryant, 1982). Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass Gene, die für basale Prozesse wie Proliferation oder Zellvitalität gebraucht werden, eine starke maternale Komponente aufweisen können. Die meisten Gewebe der Larve proliferieren nicht oder nur wenig, so dass die maternale Komponente dieser Gene bis hin zum Puppenstadium ausreichen kann. Dies ist für hoch proliferative Gewebe, wie die Imaginalscheiben, nicht der Fall, da die maternale Komponente auf viele Zellen verteilt werden muss. Die Imaginalscheiben bleiben daher in solchen Mutanten klein, weil die Zellen nicht ausreichend proliferieren können oder weil die Zellen später absterben.

Die Funktion des Gens *CG13933* könnte ebenfalls betroffen sein, da eventuell in *Df(3L)kloP3* Promotorsequenzen für dieses Gen beeinträchtigt sind. Es codiert für ein 671 Aminosäuren großes Protein, das drei Ankyrin repeats und eine C-terminale SOCS (Suppressors Of Cytokines Signaling) Box Domäne enthält (Flybase), über mögliche Funktionen dieses Gens ist aber bisher nichts bekannt.

Die so genannte *dras-roughend-ecdysonless* Region (*dre*; 62B3-62D4) wurde genetisch ausgiebig auf Letalfaktoren untersucht (Sliter et al., 1989). Im ersten Segment dieser Region wurde für die beiden Komplementationsgruppen *dre-1* (*discs lost*) und *dre-2* beschrieben, dass sie zu einem Verlust der Imaginalscheiben führen (Sliter et al., 1989). Aufgrund der hier vorgenommenen Eingrenzung des *no name yet* Locus, kann vermutet werden, dass *nny* der Komplementationsgruppe *dre-2* entspricht. Die Allele dieser Studie sind aber leider nicht mehr erhältlich, da die Stämme ausgestorben sind (persönliche Mitteilung J. Pielage bzw. T.J. Sliter).

In Zukunft sollte es durch eine Rettungsexperimente möglich sein, die *no name yet* Mutationen auf eines der vier Gene zu kartieren.

### 4.1.2 *discs lost*

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass *discs lost* Mutationen das Gen *patj* betreffen (Bhat et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist, sondern dass *discs lost* durch *CG32315* codiert wird. Die Evidenzen dafür sind: 1. Es konnten keine Mutationen in den untersuchten *discs lost*

## Diskussion

Allelen für den *patj* ORF identifiziert werden 2. die *Patj* Expression ist in den untersuchten Allelen nicht beeinträchtigt 3. der *discs lost* RNAi Phänotyp ist sensitiv für die *discs lost* Gendosis 4. in *discs lost* Mutanten konnten vorzeitige Stoppmutationen im *CG32315* ORF identifiziert werden und 5. verschiedene *discs lost* mutante Kombinationen lassen sich durch die Expression von *CG32315* zu voller Vitalität retten.

### **4.1.2.1 *discs lost* wird nicht für epitheliale Zellpolarität benötigt**

Für *discs lost* Mutationen wurde berichtet, dass sie epitheliale Zellpolarität beeinträchtigen (Bhat et al., 1999; Izaddoost et al., 2002; Tanentzapf et al., 2000). Da sich diese Aussagen auf die Untersuchung der Defizienz *Df(3L)My10* stützen, die neben *patj* noch die Gene *discs lost*,  $\alpha$ -*spectrin*, *cdc37* und weitere betrifft, wurden die *discs lost* EMS Allele auf eventuelle Polaritätsphänotypen untersucht. Dabei konnte für keinen der untersuchten Zellpolaritätsmarker eine Fehllokalisierung in mutantern Gewebe gefunden werden, so dass geschlossen werden muss, dass *discs lost/CG32315* keine Funktion in der Etablierung oder Aufrechterhaltung von Zellpolarität hat.

### **4.1.2.2 *discs lost* kodiert keinen $\alpha$ -Spectrin Regulator**

Aufgrund der engen, genomischen Beziehung von *discs lost* und  $\alpha$ -*spectrin* (Abb. D1) wurde spekuliert, dass *klötzchen CG32315* betrifft und es sich um einen Regulator der  $\alpha$ -*spectrin* mRNA Stabilität handelt (Pielage, 2002; Stork, 2002). Zwar konnten in *klötzchen* Mutanten Aminosäureaustausche identifiziert werden (Pielage, 2002), jedoch treten diese homozygot auch in Wildtyppopulationen auf (Fanara et al., 2002). Diese können damit nicht für die Letalität in *klötzchen* Mutanten verantwortlich sein.

Weiterhin komplementieren *discs lost* Allele die *klötzchen* Mutationen, so dass *klötzchen* ein anderes Gen betreffen muss. Durch die Analyse von *discs lost* Mutanten und gewebsspezifischer *discs lost* RNAi Behandlung konnte gezeigt werden, dass *discs lost* keinen Einfluss auf die  $\alpha$ -Spectrin Expression hat.

#### **4.1.2.3 Das Überdauern der maternalen *discs lost* Komponente**

In *discs lost* Mutanten kommt es zu einer zellautonomen Reduktion der Zellzahl in den Imaginalscheiben. Dabei zeigte sich in klonalen Analysen, dass *discs lost* mutante Zellen initial mit vergleichbarer Geschwindigkeit proliferieren, wie die umgebenden Wildtypzellen. Später in der Entwicklung kommt es jedoch zu Zelltod in den mutanten Zellen. Dieser Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der Ausgangszelle, in der die mitotische Rekombination stattfindet, große Mengen an *discs lost* mRNA und Protein vorhanden sein könnten, die dann in der mutanten Tochterzellen auch nach mehreren Teilungen noch ausreichend wäre, um *discs lost* Funktion zu gewährleisten. Mit steigender Zahl der Zellteilung und der damit einhergehenden „Verdünnung“ von *discs lost* mRNA und Protein käme es dann vermehrt zu Zelltod.

Insgesamt war die Ausprägung des *discs lost* Phänotyps sehr variabel. Dies könnte zum einen mit dem Einfluss überdauernder *discs lost* Funktion zusammenhängen (z.B. auch der maternalen Komponente) oder aber auch auf eine Anfälligkeit der *discs lost* mutanten Zellen auf verschiedene Umwelteinflüsse hindeuten.

In *discs lost* Mutanten sind vor allem die Imaginalscheiben betroffen. In den nicht proliferierenden Geweben konnten dagegen keine morphologischen Defekte beobachtet werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es durch die starke Proliferation dieser Zellen zu einem früheren Verlust der maternalen *discs lost* Komponente kommt, als in den wenig proliferierenden Geweben der Larve. *In situ* Hybridisierungen zeigen allerdings, dass *discs lost* mRNA in den Imaginalscheiben besonders stark exprimiert wird, während nicht proliferierende Gewebe deutlich geringere Expression aufweisen. Damit ist nicht klar, ob sich die Defekte auf die Imaginalscheiben beschränken, weil die Zellen hier besonders stark proliferieren oder ob die *discs lost* Funktion überhaupt nur in Imaginalscheibenzellen benötigt wird.

Die schwache Expression in den anderen Geweben in der Larve und die starke ubiquitäre Expression im Embryo (Pielage, 2002) deuten aber auf eine Funktion von *discs lost* auch in wenig proliferierenden Zellen hin.

#### **4.1.2.4 *discs lost* mutante Zellen haben einen Selektionsnachteil**

Auffällig ist, dass das Überleben der *discs lost* mutanten Zellen offenbar auch von der Proliferationsrate der umgebenden Zellen abhängt. Dieses Phänomen wird als

## Diskussion

Zell-Kompetition bezeichnet. Sich schneller teilende Zellen können sich hierbei gegenüber langsamer teilenden Zellen durchsetzen und es kommt zum Absterben der unterliegenden Zellen (Diaz and Moreno, 2005; Garcia-Bellido et al., 1973; Simpson, 1979; Simpson and Morata, 1981). Dieser Effekt wird bei der Generierung von Klonen durch mitotische Rekombination ausgenutzt, um die Größe des homozygot mutanten Klons gegenüber dem heterozygoten *Minute* Gewebe zu erhöhen (Newsome et al., 2000; Simpson and Morata, 1981).

Bei *Minute* Mutationen handelt es sich in der Regel, um Mutationen in ribosomalen Proteinen. Sie führen in Heterozygose zu einem verlangsamten Wachstum, weil es zu verlangsamer Proteinbiosynthese kommt (Lambertsson, 1998; Marygold et al., 2005).

In einem solchen *Minute* Hintergrund konnten *discs lost* mutante Zellen auch in den adulten Tieren beobachtet werden, während die Zellen in einem wildtypischen Hintergrund nicht bis in die Fliege überlebten. Die abgeschwächte Zell-Kompetition im *Minute* Hintergrund führt so zu einer höheren Überlebenschance der *discs lost* mutanten Zellen.

Allerdings kommt es auch in homozygoten *discs lost* Larven, in denen die mutanten Zellen nur mit ebenfalls *discs lost* mutanten Zellen konkurrieren, zu Zelltod. Auch kann der *discs lost* Phänotyp nicht durch die Expression von Myc gesteigert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Myc zu einer gesteigerten Ribosomen Synthese und gesteigertem Wachstum der Zellen führt (Grewal et al., 2005). Myc überexprimierende Zellen verhalten sich gegenüber Wildtypzellen als „Super-Kompetitoren“ und haben diesen gegenüber einen Proliferationsvorteil (Grewal et al., 2005; Johnston et al., 1999; Moreno and Basler, 2004). Dieser Effekt von Myc Überexpression kann allerdings die Defekte in *discs lost* mutanten Zellen nicht kompensieren, so dass neben der Zell-Kompetition weitere Mechanismen für das Absterben der *discs lost* Mutanten Zellen verantwortlich sein müssen.

### 4.1.2.5 Discs lost ist kein Regulator der Apoptose

Da es in *discs lost* Mutanten zu Zelltod kommt, wäre es möglich, dass *discs lost* an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Allerdings kann das Absterben der Zellen durch die Expression von P35 nicht verhindert werden, so dass in *discs lost* nicht an der Regulation der Apoptose beteiligt ist, sondern wahrscheinlich essentielle Vitalfunktionen der Zelle erheblich beeinträchtigt. Das P35 Protein stammt aus einem

## Diskussion

Baculovirus und es kann Apoptose unterdrücken, indem es Caspasen inhibiert (Goyal, 2001; Hay et al., 1994). Dadurch wird die Entfernung einer befallenen Wirtszelle verhindert und so eine effektive Vermehrung des Virus gewährleistet.

Allerdings ist *discs lost* auch nicht streng zellletal. In *eyFLP Minute* Klonen sind zwar die Augen verkleinert, allerdings werden durchaus noch mutante Ommatiden gebildet. Ob dies mit dem Überdauern der maternalen mRNA zusammenhängt oder ob der Phänotyp den tatsächlichen Effekt des *discs lost* Verlustes widerspiegelt, ist zurzeit unklar.

### 4.1.2.6 Mögliche Rolle von *Discs lost* im Zellzyklus

Es konnten in *discs lost* mutanten Klonen keine mehrkernigen Zellen oder Zellen mit verändertem DNA-Gehalt beobachtet werden. Die DNA Synthese scheint in *discs lost* mutanten Klonen nicht beeinträchtigt. Dennoch ergeben sich aus den Experimenten mögliche Hinweise auf einen Einfluss des Zellzyklus auf die *discs lost* Funktion.

In der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe wird die Organgröße streng reguliert, so dass es zu einer Entkopplung von Zellwachstum und Zellteilung kommen kann (Johansen and Johansen, 1997; Neufeld et al., 1998a). So führt die Induktion von vermehrter Zellteilung zu einem Anstieg der Zellzahl bei gleichzeitiger Reduktion der Zellgröße. Umgekehrt kommt es bei der Inhibition von Zellteilung zu vergrößerten Zellen, so dass die Gesamtgröße des Flügels weitgehend normal bleibt. Diese vergrößerten Zellen können statt einem, mehrere Trichome ausbilden (Katzen et al., 1998; Weigmann et al., 1997).

Dieser Phänotyp kann auch in *discs lost* RNAi behandelten Zellen im Flügel beobachtet werden. Bei starker RNAi Behandlung kam es ebenfalls zu größeren Zellen mit mehreren Trichomen. Allerdings konnte die reduzierte Anzahl von Zellen die wildtypische Größe der *patched* Domäne nicht gewährleisten, sondern es kam trotz der Größenzunahme der Zellen zu einer erheblichen Reduktion des Abstandes zwischen den Flügelvenen L3 und L4. Die Vergrößerung der Zellen lässt einen Defekt in der Progression des Zellzyklus vermuten, wobei allerdings auch das Wachstum der Zellen eingeschränkt zu sein scheint.

Cyclin E ist in *Drosophila* ein potenter Initiator von Proliferation, indem es den Eintritt von der G1 Phase in die S-Phase fördert (Knoblich et al., 1994; Neufeld et al., 1998a). Tatsächlich konnte in der Überexpression von Cyclin E in der *patched*

## Diskussion

Domäne eine leichte Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Zellgröße.

Die Expression von Cyclin E im *discs lost* RNAi Hintergrund führt dagegen nicht zu einer erhöhten Zellzahl, sondern zu einer dramatischen Verstärkung des *discs lost* Phänotyps. Dieser Effekt basiert aber wohl nicht auf einem direkten Zusammenhang von *discs lost* und *cyclin E* Funktion, da der *discs lost* RNAi Phänotyp nicht durch die Reduktion der Gendosis von *cyclin E* moduliert werden kann.

Es wäre möglich, dass es in *discs lost* mutanten Zellen zu einer verlängerten G1 Phase kommt, in der die Zellen in gewissem Maße in der Lage sind zu überleben. Werden sie dagegen durch Cyclin E Überexpression in die S-Phase gezwungen, kommt es zu Defekten und schließlich zum Zelltod. Die Koüberexpression von String fördert den Eintritt aus der G2 Phase in die M-Phase (Neufeld et al., 1998a) und zeigt keinen wesentlichen Effekt auf den *discs lost* RNAi induzierten Phänotyp. Auch die Überexpression von Cyclin A, welches für den Eintritt aus der G2 Phase in die M-Phase benötigt wird (Dienemann and Sprenger, 2004; Knoblich and Lehner, 1993), moduliert den Phänotyp nicht. Damit scheinen vor allem die G1 und S-Phase sensitiv für den Verlust von *discs lost* zu sein.

Eine alternative Erklärung des Cyclin E Effektes wäre, dass es durch die mittels Cyclin E Expression erzwungenen Zellteilungen, zu einer Verdünnung der restlichen mRNA- und Proteinexpression von *discs lost* kommt. Die nun reduzierte *discs lost* Menge, wäre nun nicht mehr in der Lage Zelltod zu verhindern. Nach diesem Modell würde es sich bei *discs lost* eher um einen allgemeinen Überlebensfaktor handeln, der unabhängig von der Zellzyklus Progression benötigt wird.

### 4.1.2.7 Codanin-1 ist das menschliche Discs lost Homolog

Im Menschen wurde das *discs lost* Homolog Codanin-1 beschrieben, ein Protein, welches in der seltenen Erbkrankheit congenital dyserythropoietic anaemia type-1 (CDA-1) mutiert ist (Dgany et al., 2002). Es zeigt eine vergleichsweise schwache Konservierung von ca. 25% identischen Aminosäuren. Allerdings erstreckt sich diese Homologie über fast den gesamten Bereich von ca. 1200 Aminosäuren, so dass die Verwandtschaft der Proteine hoch signifikant ist.

Die menschliche Erkrankung CDA-1 ist gekennzeichnet durch eine Blutanämie, die durch unzureichende Proliferation der Erythroblasten verursacht wird (Wickramasinghe, 1997; Wickramasinghe, 2000). Es treten gehäuft zwei- bis

## Diskussion

dreikernige Zellen auf, auch findet sich zum Teil noch Chromatin zwischen sich schon fast geteilten Erythroblasten. In ca. 60% der Zellen kommt es zu einem Stopp des Zellzyklus vor Beendigung der S-Phase. Darüber hinaus ist typischerweise ein schwammartig aufgelockertes Heterochromatin zu finden und es kommt zu Einstülpungen der Kernmembran in das Innere des Nukleus. Schließlich kommt es zu Apoptose und verstärkter Phagozytose der besonders stark betroffenen Zellen (Wickramasinghe, 1997; Wickramasinghe, 2000).

Trotz der recht schwachen Konservierung wäre es möglich, dass auch das *Drosophila discs lost* ähnliche Funktionen wie das Homolog des Menschen ausführt. In den *Drosophila* Mutanten finden sich ähnliche Defekte. Die Proliferation ist gestört und es kommt zu vermehrtem Zelltod. Dabei ist der Phänotyp variabel und nicht alle Zellen sind gleich stark betroffen. Auch die Anzahl der Hämocyten ist in *Drosophila discs lost* Mutanten reduziert. Bisher konnten allerdings zelluläre Defekte, wie sie für Erythroblasten in CDA-1 Patienten beschrieben sind, in *Drosophila* nicht beobachtet werden. Durch die Analyse des *discs lost* RNAi Phänotyps im Flügel und die Modulation durch Cyclin E ergeben sich aber Hinweise auf Defekte in der Progression des Zellzyklus. Da Cyclin E den Eintritt in die S-Phase aus der G1 Phase fördert, könnte aus der Verstärkung des *discs lost* RNAi Phänotyps eine Rolle für Discs lost am wahrscheinlichsten in der G1 oder S-Phase abgeleitet werden. Dies würde gut mit dem CDA-1 Phänotyp übereinstimmen, in dem es ebenfalls innerhalb der S-Phase zu Defekten kommt (Wickramasinghe, 1997; Wickramasinghe, 2000).

Die bisher gewonnenen Daten deuten nur indirekt auf eine Rolle von *discs lost* im Zellzyklus hin. So müsste z.B. durch eine FACS Analyse von *discs lost* mutanten Zellen der Zellzyklusstatus genau bestimmt werden. Auch müsste der zelluläre Phänotyp der *discs lost* mutanten Zellen im Detail untersucht werden, um herauszufinden, ob es Ähnlichkeiten zum CDA-1 Phänotyp gibt. Um zu testen, wie ähnlich *discs lost* und Codanin-1 Funktion tatsächlich sind, könnten Rettungsversuche der *Drosophila discs lost* Mutanten mit menschlichem Codanin-1 unternommen werden.

### 4.1.3 Funktion von Patj

Für Patj wurde in *Drosophila* eine Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Zellpolarität beschrieben (Bhat et al., 1999; Izaddoost et al., 2002; Tanentzapf et al., 2000). Allerdings wurde in diesen Untersuchungen der *patj*

## Diskussion

Phänotyp vor allem über die Analyse der Defizienz *Df(3L)My10* analysiert. Diese Defizienz deletiert neben *patj* noch weitere Gene. Um spezifisch den Verlust von Patj zu analysieren, wurde in dieser Arbeit versucht die Letalität von *Df(3L)My10* durch Rettungskonstrukte für die Gene  *$\alpha$ -spectrin*, *discs lost* und *cdc37* zu retten. Tatsächlich konnten *Df(3L)My10* Tiere durch die Rettungskonstrukte zu Vitalität gerettet werden. Da die Tiere keine äußeren morphologischen Defekte und eine normale Morphologie des polar organisierten Follikelepithels der Ovarien aufwiesen, wurde angenommen, dass Patj keine Funktion in der Etablierung oder Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität besitzt (Pielage et al., 2003).

Es zeigte sich allerdings, dass es in den geretteten Fliegen im Auge zu einer Fehllokalisierung von Crumbs kommt (E. Knust, persönliche Mitteilung). Crumbs ist ein Transmembranprotein, das über die kurze cytoplasmatische Domäne andere Proteine binden kann und für epitheliale Zellpolarität essentiell ist (Klebes and Knust, 2000; Medina et al., 2002; Wodarz et al., 1995). Es interagiert z.B. mit Stardust, einem MAGUK Protein (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001), welches wiederum Patj binden kann (Roh et al., 2002). Diese drei Proteine bilden einen Komplex, der in der Evolution konserviert ist und in dem die Komponenten in ihrer Funktion voneinander abhängen (Lemmers et al., 2002; Michel et al., 2005; Shin et al., 2005).

In den geretteten Patj Fliegen kommt es trotz der äußerlich normalen Entwicklung zu einer Fehlverteilung der Polaritätsdeterminante Crumbs, so dass Patj doch eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität besitzt. Diese Funktion in der Zellpolarität von Patj wird auch durch neuere Studien in Säugerzellen bestätigt (Michel et al., 2005; Shin et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patj eine Rolle in der planaren Polarität spielt (Djiane et al., 2005).

Dass es in der *Df(3L)My10* Rettung zu einer vollkommen normalen äußeren Morphologie kommt, hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass das genomische Rettungsfragment *P[cdc37]* Teile des *patj* Gens enthält. So konnte in den geretteten Fliegen ein Patj Proteinfsegment nachgewiesen werden, das die erste PDZ-Domäne enthält (E. Knust persönliche Mitteilung). Dieses Fragment konnte in den Western Blots, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, nicht nachgewiesen werden, da ein Antiserum verwendet wurde, welches sich gegen den C-Terminus von Patj richtet (Tanentzapf et al., 2000). Das N-terminale Patj Fragment scheint also eine gewisse

## Diskussion

Restfunktion zu vermitteln und so zu der milden Ausprägung in den geretteten *Df(3L)My10* Tieren zu führen.

### 4.1.4 $\alpha$ -spectrin/klötzchen

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sich bei den *klötzchen* Allelen um Mutationen in  $\alpha$ -spectrin handelt. Wie bereits von Pielage, 2002 beschrieben können *klötzchen* Mutationen durch die Expression eines  $\alpha$ -spectrin Minigens zu voller Vitalität gerettet werden. Die Expression des  $\alpha$ -spectrin Proteins ist in den *klötzchen* Allelen *E2-26* und *D4-65* bis auf die maternale Komponente reduziert. Außerdem konnte für das Allel *E2-26* ein vorzeitiges Stoppcodon identifiziert werden. Dies führt zu einem verkürzten  $\alpha$ -Spectrin Protein von 83 Aminosäuren statt der 2415 Aminosäuren im wildtypischen Protein. Ein von allen letalen Hintergrundmutationen gereinigtes *klötzchen*<sup>*E2-26*</sup> Chromosom zeigt einen vergleichbaren ZNS Phänotyp wie das publizierte Nullallel  $\alpha$ -spectrin<sup>*g41*</sup> und lässt sich durch ein  $\alpha$ -spectrin Minigen zu voller Vitalität retten.

Auch konnte gezeigt werden, dass das Gen *CG32315* nicht für *klötzchen*, sondern für *discs lost* codiert (siehe oben).

#### 4.1.4.1 Kältesensitivität

Sowohl  $\alpha$ -spectrin als auch  $\beta$ -spectrin Mutanten zeigen einen kältesensitiven ZNS Phänotyp. Während in den  $\alpha$ -spectrin Mutanten ohne eine Kältebehandlung keine wesentlichen Defekte auftreten, kommt es durch eine Lagerung bei 4°C zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Axonmusters. Auch im Wildtyp kann es durch eine lang anhaltende Kältebehandlung zu Defekten im ZNS kommen, diese fallen aber deutlich geringer aus, als in  $\alpha$ -spectrin oder vor allem  $\beta$ -spectrin Mutanten. Die  $\beta$ -spectrin Mutante zeigt auch ohne Kältebehandlung Defekte im ZNS (Hülsmeier, 2005).

Zurzeit ist nicht klar, wie der ZNS Phänotyp entsteht. Durch die Kältebehandlung kommt es in  $\alpha$ -spectrin/*klötzchen* Mutanten zu einer Verkleinerung des interkommissuralen Raumes, teilweise sogar zu einer kompletten Fusion von anteriorer und posteriorer Kommissur. Außerdem sind die Konnektive deutlich verdünnt.

## Diskussion

Die Fusion der Kommissuren könnte auf Defekte in den Mittellinienglia zurückzuführen sein. So konnte gezeigt werden, dass die Morphologie der Mittellinienglia in *klötzchen* Mutanten mit Kältebehandlung deutlich beeinträchtigt ist (siehe Einleitung).

In dieser Arbeit habe ich eine generell schwächere Ausprägung des *klötzchen* ZNS Phänotyps beobachtet, als dies von Pielage, 2002 und Hummel et al., 1999 (a+b) beschrieben wurde. Auch wurden die *klötzchen* Mutationen (Mutationen in  $\alpha$ -*spectrin*) ursprünglich in die so genannte *pointed* Gruppe eingeordnet, die sich durch eine Fusion der Kommissuren bei reduzierter Mittellinienglia Anzahl auszeichnet. Für die *karussell* Allele (Mutationen in  $\beta$ -*spectrin*) wurde dagegen beschrieben, dass es sich um Defekte in der axonalen Wegfindung handelt (Hummel et al. 1999).

In dieser Arbeit stellten sich die kältesensitiven Phänotypen von  $\alpha$ -*spectrin* und  $\beta$ -*spectrin* als durchaus ähnlich heraus, wobei die Defekte in  $\beta$ -*spectrin* generell stärker ausfallen als in  $\alpha$ -*spectrin*. Dies korreliert gut mit bisher publizierten Daten, in denen sich der Ausfall von  $\beta$ -*spectrin* stärker auswirkt, als der Ausfall von  $\alpha$ -*spectrin* (Dubreuil et al., 2000). Ob dies mit einer unterschiedlichen stark ausgeprägten maternalen Komponente oder mit unabhängigen Funktionen der beiden Untereinheiten zusammenhängt, ist zurzeit unklar. Für  $\beta$ -Spectrin ist auffällig, dass zumindest in starken Allelen auch ohne eine Kältebehandlung Defekte im Axonmuster auftreten (Hülsmeier, 2005).

### 4.1.4.2 Die Rolle von Hintergrundmutationen

Bisher ist nicht geklärt, warum die  $\alpha$ -*spectrin* Nullmutationen eine schwächere Kältesensitivität zeigt als z.B. die transheterozygote Kombination  $P[kloP2]/\alpha$ -*spectrin*<sup>E2-26</sup>. Eine Erklärung könnten modifizierende Hintergrundmutationen sein. Insgesamt zeigten alle *klötzchen* Allele verschiedene Hintergrundmutationen. Da aber auch transheterozygote Kombinationen, die keine gemeinsamen Hintergrundmutationen tragen, eine Verstärkung der Kältesensitivität gegenüber gereinigten Nullmutationen zeigen, muss davon ausgegangen werden, dass diese Hintergrundmutationen heterozygot den Phänotyp beeinflussen können. Da offensichtlich eine Reihe verschiedener Mutationen in der Lage ist, den kältesensitiven Phänotyp zu modifizieren, scheint es sich nicht um einen besonders spezifischen Effekt zu handeln. Insgesamt zeigt die Kältebehandlung doch eine zu

## Diskussion

hohe Variabilität, als dass der Einfluss einzelner modifizierender Mutationen untersucht werden könnte.

### **4.1.4.3 Genereller Einsatz der Kältebehandlung**

Die Kältebehandlung führte generell zu recht variablen Ergebnissen. So zeigten sich in der Wiederholung von Experimenten, dass die Ausprägung des Phänotyps erheblich abweichen kann. Dies ist möglicherweise auf Schwankungen im Eiablageverhalten der Fliegen und auf Temperaturschwankungen bei der Kühlschrankschlagerung zurückzuführen. So sind unter Umständen auch die Diskrepanzen in der Beschreibung der *klötzchen* Phänotypen in dieser Arbeit zu Pielage, 2002 und Hummel et al, 1999 zu erklären.

Es sollte daher generell auf eine Lagerung der Embryonen bei 4°C verzichtet werden.

### **4.1.4.4 Mögliche Funktion von Spectrin in der Kälteresistenz**

Darüber wie Spectrine eine Kälteresistenz vermitteln, kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass das Spectrin Cytoskelett die Aufrechterhaltung von Zellkontakten und Zellform gewährleistet. Fehlt die Spectrin Funktion könnten Membrandomänen und Kontaktstellen mit anderen Zellen instabiler werden und durch den Kältestress ganz verloren gehen. Spectrine gelten als wichtige Schnittstelle zwischen Membran und Cytoskelett (Bennett and Baines, 2001). So können Spectrin Heterotetramere sowohl membranassoziierte Proteine und Transmembranproteine als auch Aktin und Mikrotubuli binden (Bennett and Baines, 2001; Sisson et al., 2000). Besonders für Mikrotubuli ist bekannt, dass sie bei 4°C sehr instabil sind und schnell degradieren (Osborn and Weber, 1976). Dieser Abbau könnte zu einer Destabilisierung von Membrandomänen führen. Fehlt zusätzlich noch das Spectrin Cytoskelett könnte es zu einer Fehllokalisierung von Proteinen und eventuell der Auflösung von Zellkontakten kommen. In der neuromuskulären Synapse konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Spectrin zu einer Fehllokalisierung von Adhäsionsmolekülen wie Neuroglian und Fasciclin II führt, und das Mikrotubuli destabilisiert sind (Pielage et al., 2005). Durch Kältebehandlung könnte dieser Effekt über die Destabilisierung der Mikrotubuli forciert werden, und so schon im Embryo zu Defekten führen. So werden Axone wesentlich durch Mikrotubuli stabilisiert (Dent and Gertler, 2003). Es könnte in den kältebehandelten Mutanten zu

## Diskussion

den verdünnten Konnektiven kommen, da die Axone destabilisiert werden und eventuell degenerieren oder dadurch, dass das Auswachsen der Axone mit destabilisiertem Mikrotubuli/Spectrin Cytoskelett nicht stattfindet (Hammarlund et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Signalprozesse beeinflusst sind. Eine Inkubation bei 4°C führt in Zellkulturzellen zu einem Stopp in der Endocytose. Dies wird für entsprechende Endocytose Untersuchungen experimentell genutzt (Fleit et al., 1987). Endocytose kann in der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielen. Einerseits können Liganden gebundene Rezeptoren durch Endocytose deaktiviert werden, andererseits kann die Internalisierung aber auch für die volle Aktivität benötigt werden (Gonzalez-Gaitan, 2003; Roegiers et al., 2005; Wang and Struhl, 2005). Die Entwicklung der Mittellinienglia ist entscheidend abhängig von der EGF-Rezeptor Aktivität und dem engen Kontakt von Mittellinienglia mit Neuronen. In kältebehandelten *spectrin* Mutanten könnte es zu einer Destabilisierung der Zellkontakte kommen, die dann zusammen mit der Reduktion der Endocytose zu einer deutlich reduzierten EGF-Rezeptor Aktivität führt. Diese Abnahme könnte so zur Apoptose in den Mittellinienglia führen, und die starken Mittellinienglia Defekte erklären, die von Pielage, 2002 beschrieben wurden.

Es scheint so, als können diverse Mutationen im Hintergrund der  $\alpha$ -*spectrin* Allele zu einer Modifikation der Kältesensitivität führen. Damit ist fraglich, wie spezifisch die Kältesensitivität für  $\alpha$ -*spectrin* ist. Es ist wahrscheinlich, dass weitere Mutationen in Genen, die basale Zellfunktionen bereitstellen, zu ähnlichen kältesensitiven Defekten führen. Unter Umständen sind einige dieser Faktoren im Screen von Hummel et al, 1999 a+b identifiziert worden.

### 4.1.4.5 Rolle von $\alpha$ -*spectrin* in der Entwicklung des Auges

In der klonalen Analyse der  $\alpha$ -*spectrin* Mutationen im Auge zeigte sich, dass die  $\alpha$ -*spectrin* Allele *D4-65*, *N2-141*, *F-1*, *N-2* und *S-1* zu einem qualitativ ähnlichen rauhe Augen Phänotyp führen. Bisher ist nicht klar, ob die verwendeten FRT Chromosomen frei von Hintergrundmutationen sind, die für den Augenphänotyp verantwortlich sein könnten. Jedoch ließe sich mit Hilfe des  $\alpha$ -*spectrin*-Minigens überprüfen, ob dies der Fall ist. Um den Ausfallphänotyp von  $\alpha$ -*spectrin* zu untersuchen war bislang nur das  $\alpha$ -*spectrin*<sup>rg41</sup> Chromosom erhältlich, das zusätzlich

eine *roughoid* Mutation trägt. Diese verursacht raue Augen und ließ sich aufgrund der cytologischen Nähe zu  $\alpha$ -Spectrin bisher nicht vom *rg41* Chromosom entfernen. Mit dem gereinigten  $\alpha$ -*spectrin*<sup>E2-26</sup> Chromosom liegt nun ein  $\alpha$ -*spectrin* Nullallel vor, das keine weiteren Mutationen im Hintergrund trägt. Wenn für dieses Chromosom eine FRT80B Rekombinante generiert würde, könnte so die Rolle  $\alpha$ -*spectrins* in der Entwicklung des Auges untersucht werden.

Die leichte Desorganisation der Ommatidien und der interommatidialen Borsten könnte auf Defekte in der Zelladhäsion der verschiedenen Zelltypen im Auge zurückzuführen sein. Während der Pupalentwicklung kommt es zu einer regelmäßigen Anordnung von Photorezeptorzellen, Kegelnzellen und der verschiedenen Pigmentzellen. Die Anordnung dieser Zellen wird vor allem durch die Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. DE-Cadherin oder *IrreC/rst* gesteuert (Bao and Cagan, 2005; Carthew, 2005; Grzeschik and Knust, 2005; Hayashi and Carthew, 2004; Reiter et al., 1996). Die Spectrin Heterotetramere können indirekt mit Zelladhäsionsmolekülen wie Neuroglian und DE-Cadherin interagieren (Dubreuil et al., 1997; Thomas and Williams, 1999). Auch wurde gezeigt, dass in  $\alpha$ -*spectrin* Mutanten die Zelladhäsion von Darmzellen gestört ist (Lee et al., 1993). Damit wäre es möglich, dass der Verlust von  $\alpha$ -Spectrin zu einer Veränderung der Adhäsionseigenschaften der verschiedenen Zellen in der Retina und so zu einer Desorganisation führt.

In der klonalen Analyse von  $\beta$ -Spectrin Allelen im Auge zeigte sich allerdings kein Phänotyp. Dennoch könnte der für  $\alpha$ -*spectrin* Allele beobachtete Phänotyp wirklich auf den Verlust von  $\alpha$ -*spectrin* zurückzuführen sein. Es wäre möglich, dass  $\alpha$ -*spectrin* Funktionen unabhängig von  $\beta$ -*spectrin* ausüben kann (Dubreuil et al., 2000; Dubreuil and Yu, 1994). Auch könnte eine Unausgeglichenheit im Verhältnis von  $\alpha$ -Spectrin zu  $\beta$ -Spectrin die Entwicklung des Auges stören. So führt der Verlust von  $\beta$ -Spectrin zu einem gleichzeitigen Verlust von  $\alpha$ -*spectrin* (Hülsmeier, 2005), während umgekehrt  $\beta$ -Spectrin in der Abwesenheit von  $\alpha$ -*spectrin* stabil ist.

#### 4.1.4.6 Charakterisierung der $\alpha$ -*spectrin* Mutanten

In dieser Arbeit konnten neue  $\alpha$ -*spectrin* Allele generiert werden, die für weitere Untersuchungen der  $\alpha$ -Spectrin Funktion von Nutzen sein könnten. So wurden einige Allele isoliert, die in trans zueinander intragene Komplementation zeigen.

## Diskussion

Diese Allele könnten Mutationen in distinkten, funktionalen Domänen tragen und sich so in trans komplementieren. Die Analyse der DNA Sequenz könnte hier interessante Aufschlüsse über die Lage dieser funktionalen Domänen geben.

In der Analyse der Proteinexpression konnten verschiedene Allele identifiziert werden, die zu einem völligen Verlust zygotischer  $\alpha$ -spectrin Expression führen (*E-2-26*, *D4-65*). Darüber hinaus exprimieren die  $\alpha$ -spectrin Allele *F-1* und *N-2* ein trunkiertes Protein. Da diese Allele bisher nicht sequenziert sind, ist nicht klar, ob diese verkürzten Formen durch Degradation oder durch verfrühte Stopp Codons zustande kommen. Beide Proteinformen zeigen in mutanten Klonen reduzierte Expression, das verbleibende Protein ist aber korrekt an der Membran lokalisiert. Zwar ist es unwahrscheinlich, dass dieses Signal durch überdauerndes Wildtyp  $\alpha$ -spectrin Protein verursacht wird, da dies in Klonen der Nullmutante selbst in sehr kleinen Klonen nicht zu beobachten ist, völlig auszuschließen ist diese Möglichkeit aber nicht.

Für das  $\alpha$ -spectrin Allel *rg35* ist publiziert, dass es durch eine Stoppmutation zu einer Deletion von 90 Aminosäuren am C-Terminus kommt und dass das Protein nicht an der Zellmembran lokalisiert (Lee et al., 1993). Die korrekte Membranlokalisierung des  $\alpha$ -Spectrin Proteins in den Mutanten *F-1* und *N-2* lässt daher vermuten, dass die Verkürzungen nicht durch vorzeitige Stoppmutationen zustande kommen, sondern durch Punktmutationen, die die Stabilität des Proteins reduzieren.

In keiner der untersuchten  $\alpha$ -spectrin Allele konnte eine Fehllokalisierung des Proteins nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass für die Stabilität des  $\alpha$ -Spectrin Proteins eine korrekte Assoziation mit  $\beta$ -Spectrin an der Zellmembran benötigt wird (Woods and Lazarides, 1985; Zarnescu and Thomas, 1999). Umgekehrt ist  $\beta$ -spectrin in seiner Lokalisation und Stabilität weitgehend unabhängig von  $\alpha$ -spectrin (Dubreuil et al., 2000; Dubreuil and Yu, 1994; Lee et al., 1997).

Der Verlust des  $\alpha$ -Spectrin Proteins in *klo*<sup>*N-2-141*</sup> Klonen ist erstaunlich, da dieses Allel in einigen transheterozygoten Kombinationen mit anderen  $\alpha$ -Spectrin Allelen zu vitalen Fliegen führt. Eine Möglichkeit wäre, dass es durch eine Deletion oder Punktmutation in *N2-141* zu einer Zerstörung des Epitops gekommen ist, welches vom monoklonalen  $\alpha$ -Spectrin Antikörper 3A9 erkannt wird. Die Lage des Epitops ist nicht genau bekannt, es liegt aber in der N-terminalen Hälfte  $\alpha$ -Spectrins ((Byers et

## Diskussion

al., 1987) Developmental Hybridoma Bank). Mit einem polyklonalen Antiserum (Byers et al., 1987) könnte überprüft werden, ob es nur zu einer Mutation des 3A9 Epitops gekommen ist oder ob das gesamte Protein fehlt.

Interessant sind die beiden  $\alpha$ -spectrin Allele *P-2* und *S-1*. Für die *P-2* Mutante konnte die Synthese eines  $\alpha$ -Spectrin Proteins voller Länge beobachtet werden. Dies wurde für *S-1* bisher nicht überprüft, beide Mutanten zeigen aber in einer klonalen Analyse in der Augen-Antennenimaginalscheibe keine Reduktion der  $\alpha$ -Spectrin Proteinmenge. Es liegen wahrscheinlich Punktmutationen vor, die funktionale Domänen betreffen. Die Mutationen scheinen nicht die Bereiche zu stören, die für die Assoziation mit  $\beta$ -Spectrin und die Heterotetramerisierung benötigt werden, sondern betreffen wahrscheinlich Assoziationsdomänen mit anderen Proteinen. So scheint z.B. in der  $\alpha$ -spectrin<sup>P-2</sup> Mutante vor allem die synaptische Funktion von  $\alpha$ -spectrin beeinträchtigt (J. Pielage, persönliche Mitteilung).

## 4.2 Rolle von Septate Junctions in der Gliaentwicklung- und Funktion

Aufgrund der initialen Beschreibung des *klötzchen* Phänotyps, wurde eine Rolle von Spectrin in den Mittellinienglia vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass die schweren Defekte in den Mittellinienglia durch eine Kältebehandlung verursacht sind. Dennoch wäre es möglich, dass Spectrin eine Rolle in der Mittellinienglia Entwicklung spielt. Das Spectrin Heterotetramer ist darüber hinaus ein (indirekter) Interaktionspartner von verschiedenen Septate Junction Proteinen wie Neurexin, Coracle, Neuroglian und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Baumgartner et al., 1996; Genova and Fehon, 2003; Lamb et al., 1998; Ward et al., 1998). So werden z.B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spectrin spezifisch zu Neuroglian vermittelten Zellkontakten rekrutiert (Dubreuil et al., 1997) und  $\beta$ -spectrin wird für die korrekte Lokalisation der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase benötigt (Dubreuil et al., 2000). Weiterhin kann Neurexin über Coracle an das Spectrin Cytoskelett binden.

Für einige der pleated Septate Junction Komponenten wie *neurexin*, *gliotactin* und *megatrachea* wurde eine Expression in Mittellinienglia vermutet (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996; Behr et al., 2003). Die Funktionen von diesen Proteinen und von Septate Junctions in der Mittellinienglia Entwicklung sind bisher aber nicht untersucht.

#### 4.2.1 Funktion von pleated Septate Junctions in *Drosophila*

Pleated Septate Junctions (engl. pSJ) sind spezielle Zellkontakte, die vor allem in primären Epithelien, wie Epidermis, Speicheldrüsen und Hinterdarm auftreten und sie bilden hier, ähnlich wie die Tight Junctions (TJ) der Vertebraten, eine parazelluläre Diffusionsbarriere. Es wurden in *Drosophila* viele Mutationen isoliert, die die Ausbildung oder Funktionalität der pSJ in diesen Geweben beeinträchtigen. Dazu gehören *neurexin IV*, *coracle*, *discs large*, *neuroglian*, *gliotactin*, *nervana* ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase), *megatrachea*, *sinuous*, *lachesin* und *contactin* (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996; Behr et al., 2003; Bilder et al., 2000; Faivre-Sarrailh et al., 2004; Genova and Fehon, 2003; Lamb et al., 1998; Llimargas et al., 2004; Paul et al., 2003; Ward et al., 1998; Woods and Bryant, 1991; Woods et al., 1997).

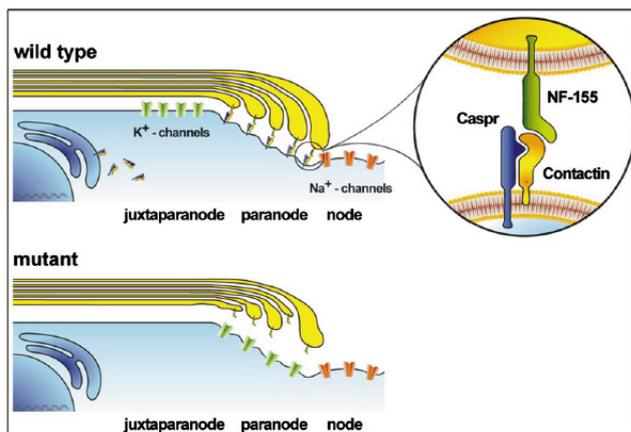
In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Septate Junctions auch im ZNS eine Diffusionsbarriere bilden, die die Neurone vor den hohen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen der Hämolymphe schützt und somit die Weiterleitung von Aktionspotentialen gewährleistet (Carlson et al., 2000; Hoyle, 1952; Juang and Carlson, 1994).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese Diffusionsbarriere, die so genannte Blut-Hirn-Schranke, vor allem durch pSJ zwischen Gliazellen gewährleistet wird. (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996; Schwabe et al., 2005). Dabei war kontrovers, ob Subperineurialglia oder Perineurialzellen diese Aufgabe übernehmen (Carlson and Hilgers, 1998; Edwards et al., 1993; Tepass and Hartenstein, 1994). Die Perineurialzellen bilden die äußerste zelluläre Schicht des ZNS und sie werden erst sehr spät in der Embryonalentwicklung sichtbar. Nachdem bisher ein mesodermaler Ursprung für diese Zellen angenommen wurde (Edwards et al., 1993), zeigen neueste Publikationen, dass sie wahrscheinlich eine Subpopulation der „Surface“-Glia sind und dass diese Zellen die eigentliche Blut-Hirn-Schranke bereitstellen (Schwabe et al., 2005). Diverse Septate Junction Marker sind hier an den Zellkontakten exprimiert. Für die SJ Proteine Neurexin, Neuroglian, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase und Gliotactin konnte gezeigt werden, dass sie erstens für die Bildung und Funktion von Septate Junctions essentiell sind und zweitens für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke benötigt werden (Auld et al., 1995; Baumgartner et al., 1996; Schwabe et al., 2005).

#### 4.2.2 Septate Junctions in Vertebraten

Interessanterweise sind Septate Junctions in der Evolution konserviert. Zwar übernehmen in Vertebraten Tight Junctions die Funktion einer parazellulären Diffusionsbarriere in den meisten Geweben, jedoch sind Septate Junction-artige Strukturen in spezialisierten Zell-Zell-Kontakten der Schwannzellen und Oligodendrozyten mit Axonen in Vertebraten zu beobachten. Hier finden sich an den Paranodien der Ranvierschen Schnürringe auf elektronenmikroskopischem Level Septae zwischen Glia und Axon, die als Diffusionsbarriere dienen und so die saltatorische Impulsleitung gewährleisten (Rosenbluth et al., 1995). Neben der strukturellen Ähnlichkeit sind auch die beteiligten Moleküle zum Teil konserviert (Abb. D2).

So sind die Vertebraten Homologe der *Drosophila* Proteine Neurexin IV, Contactin und Neuroglian (Caspr; Contactin und NF-155) in den Paranodien konzentriert und zumindest Caspr und Contactin sind für die Ausbildung der SJ-ähnlichen Kontaktstellen zwischen Gliazelle und Axon essentiell (Abb. D3, (Bhat, 2003; Einheber et al., 1997)). Caspr und Contactin sind axonal exprimiert und bilden einen Komplex, der an das gliale NF-155 Protein binden und es so an den Paranodien konzentrieren kann (Boyle et al., 2001; Peles et al., 1997; Poliak and Peles, 2003).



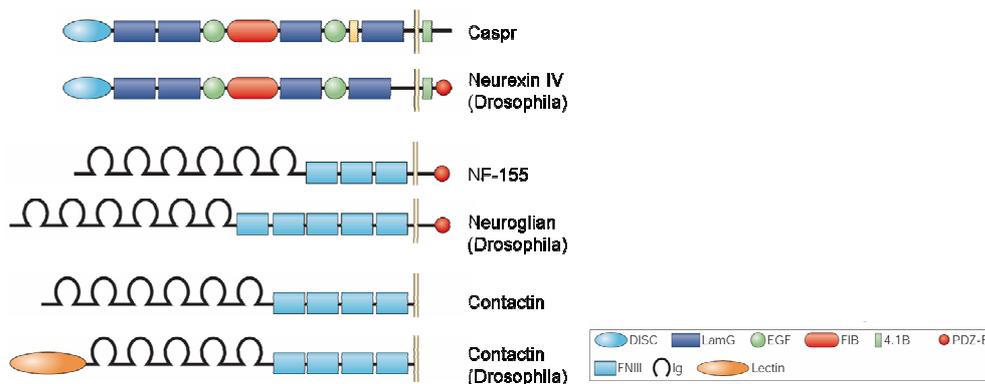
**Abb. D2: Schematische Darstellung der Domänen am Ranvierschen Schnürring.** Contactin und Caspr sind für die Ausbildung paranodaler SJ essentiell. In den Mutanten kommt es zu einer Auflösung der Zell-Zell-Kontakte zwischen Gliazelle (Gelb) und Axon (blau), so dass die parazelluläre Diffusionsbarriere aufgehoben ist. Abbildung aus Boyle et al., 2001.

Neurexin IV/Caspr bindet über den C-Terminus an das cytoplasmatische Coracle/Bande 4.1 Protein und kann so z.B. mit dem Spectrin Cytoskelett interagieren (Bennett and Baines, 2001; Ward et al., 1998).

In *Drosophila* wurden neben *neurexin IV*, *contactin*, *coracle* und *neuroglian* eine Reihe weiterer Mutationen isoliert, die für die Integrität der Septate Junctions essentiell sind (siehe oben). Ob diese Proteine eine Funktion in den Septate

## Diskussion

Junctions der Paranodien der Vertebraten haben, werden zukünftige Untersuchungen klären.



**Abb. D3: Schematischer Vergleich einiger Paranodien/Septate Junction assoziierter Proteine.** Die Domänenstruktur der *Drosophila* Proteine Neurexin, Neuroglian und Contactin und ihren Vertebratenhomologen. DISC: Discoidin-like Domäne; EGF: EGF-Repeats; FIB: Fibrinogen-like Domäne; FNIII: Fibronectin-III-like Domäne; Ig: Immunoglobulin-like Domäne; LamG: Laminin G Domäne; PDZ-B: PDZ-binding domain. Abbildung verändert aus Poliak and Peles, 2003.

### 4.2.3 Funktion von Septate Junctions und des Spectrin Cytoskeletts in der Entwicklung der Mittellinienglia

#### 4.2.3.1 Funktion von *neurexin* in Mittellinienglia

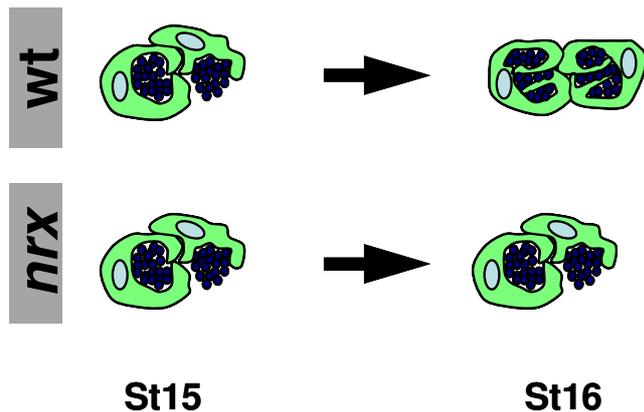
Neurexin IV zeigt neben der Expression in primären Epithelien und in Perineurialzellen eine ausgeprägte Expression in den Mittellinienglia. Es lokalisiert schon früh an bestimmten Kontaktstellen von Mittellinienglia mit Neuronen.

In der Analyse der *neurexin* Mutante zeigten sich aber in frühen Stadien keine Defekte, sondern erst während der Umhüllung der Kommissuren der kommissuralen Axone. Die anteriore Kommissur wurde zum Teil noch umhüllt, während die posteriore Kommissur allenfalls dorsal oder ventral bedeckt war. Es kommt nie zu einer Umhüllung der kommissuraler Axone durch gliale Fortsätze. Vielmehr ähnelt die Morphologie der Mittellinienglia der *neurexin* Mutante im Stadium 16 dem Differenzierungsgrad, den man im Wildtyp im Stadium 15 finden kann, so dass spezifisch die Umhüllung der Axone betroffen zu sein scheint.

Im Stadium 17 kommt es in der *neurexin* Mutante schließlich zu einer Abnahme der Expression des Zelladhäsionsmoleküls Wrapper. Zurzeit ist noch nicht klar, ob diese

## Diskussion

Abnahme mit einem Absterben der Mittellinienglia zusammenhängt oder ob der Ausfall von *neurexin* einen direkten Effekt auf die Wrapper Expression und Lokalisation hat. Wrapper ist in der *neurexin* Mutante im Stadium 16, in dem sich bereits die Umhüllungsdefekte zeigen, noch vergleichbar stark zum Wildtyp exprimiert, so dass der *neurexin* Phänotyp nicht durch eine geringere Expression von *wrapper* verursacht sein kann.



**Abb. D4: Prozess der Umhüllung der Kommissuren.** Im Stadium 15 sind die Kommissuren (blau) im Wildtyp noch nicht vollständig von Mittellinienglia umschlossen. Erst im Stadium 16 sind die Kommissuren ganz von Gliazellen umgeben und die kommissuralen Axone werden durch gliale Fortsätze umhüllt. In *neurexin* Mutanten kommt es nicht zu diesem Schritt und die Differenzierung der Mittellinienglia ist im Stadium 16 mit der des Wildtyps im Stadium 15 vergleichbar.

In *wrapper* Mutanten sterben die Mittellinienglia früh ab, so dass sie die Kommissuren nicht korrekt trennen können und sich ein fusionierte Kommissuren Phänotyp entwickelt (Noordermeer et al., 1998). Dieser Effekt ist in *neurexin*<sup>4304</sup> Tieren nicht zu beobachten. Obwohl Neurexin auch in früheren Stadien exprimiert ist, kommt es nicht zu frühzeitigen Defekten in den Gliazellen und das Axonmuster kann sich normal ausbilden. Da für Neurexin keine maternale Komponente beschrieben ist und das verwendete Allel stark hypomorph ist, scheint Neurexin eine von Wrapper unabhängige, spätere Funktion in der Umhüllung der Axone zu haben.

### 4.2.3.2 Mögliche Rolle von Septate Junctions in der Mittellinienglia Entwicklung

Da Neurexin für die Bildung von pSJ in primären Epithelien essentiell ist, ergeben sich hier Hinweise auf eine mögliche Funktion von Septate Junctions bei der Umhüllung der Axone durch Mittellinienglia. Allerdings sind nicht alle Septate Junction Marker in Mittellinienglia exprimiert. So konnte z.B. für Lachesin (Peitz,

## Diskussion

2005) und Coracle keine Expression in Mittellinienglia beobachtet werden. Auch die publizierte Expression von Contactin und Megatrachea in Mittellinienglia ist sehr fraglich. Nach den veröffentlichten Aufnahmen zu urteilen, handelt es sich anscheinend um Expression von „Surface“-Glia im dorso-ventral Kanal des ZNS (Auld et al., 1995; Behr et al., 2003).

Bisher ist nicht untersucht, ob Mittellinienglia Septate Junctions ausbilden. Da einige Faktoren, die in ektodermalen Geweben für die Ausbildung von Septate Junctions benötigt werden, in den Mittellinienglia nicht exprimiert sind, muss man entweder annehmen, dass Mittellinienglia keine Septate Junctions ausbilden oder dass zum Teil alternative Mechanismen und Faktoren für deren Ausbildung verantwortlich sind. So ist z.B. denkbar, dass über die Zusammensetzung der Septate Junction assoziierten Proteine die Permeabilität und die Selektivität der Diffusionsbarriere gesteuert werden kann.

Da direkte Interaktionspartner von Neurexin, wie Coracle und Contactin, für die entscheidende Rollen in der Etablierung von Septate Junctions und der Lokalisation von Neurexin beschrieben wurden, (wahrscheinlich) nicht in den Mittellinienglia exprimiert sind, ist es möglich, dass Neurexin hier eine Funktion unabhängig von Septate Junctions hat. Auch könnte Neurexin als heterophiles Adhäsionsmolekül für engen Zellkontakt sorgen, ohne dass Septate Junctions differenziert werden müssen (Baumgartner et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 2004).

In Zukunft werden detaillierte elektronenmikroskopische Untersuchungen klären, ob sich Septate Junctions in den Mittellinienglia nachweisen lassen und damit auch die Rolle von Neurexin in Mittellinienglia besser charakterisieren.

### **4.2.3.3 Funktion von *spectrin* in Mittellinienglia**

Da das Spectrin Heterotetramer mit verschiedenen Septate Junction Markern interagiert wurde die Morphologie der Mittellinienglia in Spectrin Mutanten untersucht. Weder für  $\alpha$ -*spectrin*, noch  $\beta$ -*spectrin* zeigten sich Defekte in der Umhüllung der Axone. Da beide Gene eine starke maternale Komponente haben, ist eine Funktion in diesem Prozess aber nicht auszuschließen. Bisher wurde mittels UAS  $\alpha$ -*spectrin* RNAi Behandlung nur getestet, ob es zu Defekten in der Trennung der Kommissuren kommt. Ob es zu vergleichsweise subtilen Phänotypen in der Umhüllung der Kommissuren kommt, wie dies für Neurexin der Fall ist, ist bisher nicht untersucht worden.

## Diskussion

Da das Adaptermolekül Coracle, das eine Assoziation von Neurexin mit dem Spectrin Cytoskelett vermitteln könnte, nicht in den Mittellinienglia exprimiert ist, ist es unwahrscheinlich, dass Spectrin hier einen direkten Einfluss auf Neurexin und die Ausbildung von Septate Junctions hat (Ward et al., 1998). Es wäre aber möglich, dass andere Septate Junction Komponenten wie z.B. Neuroglian in den Mittellinienglia mit dem Spectrin Cytoskelett interagieren.

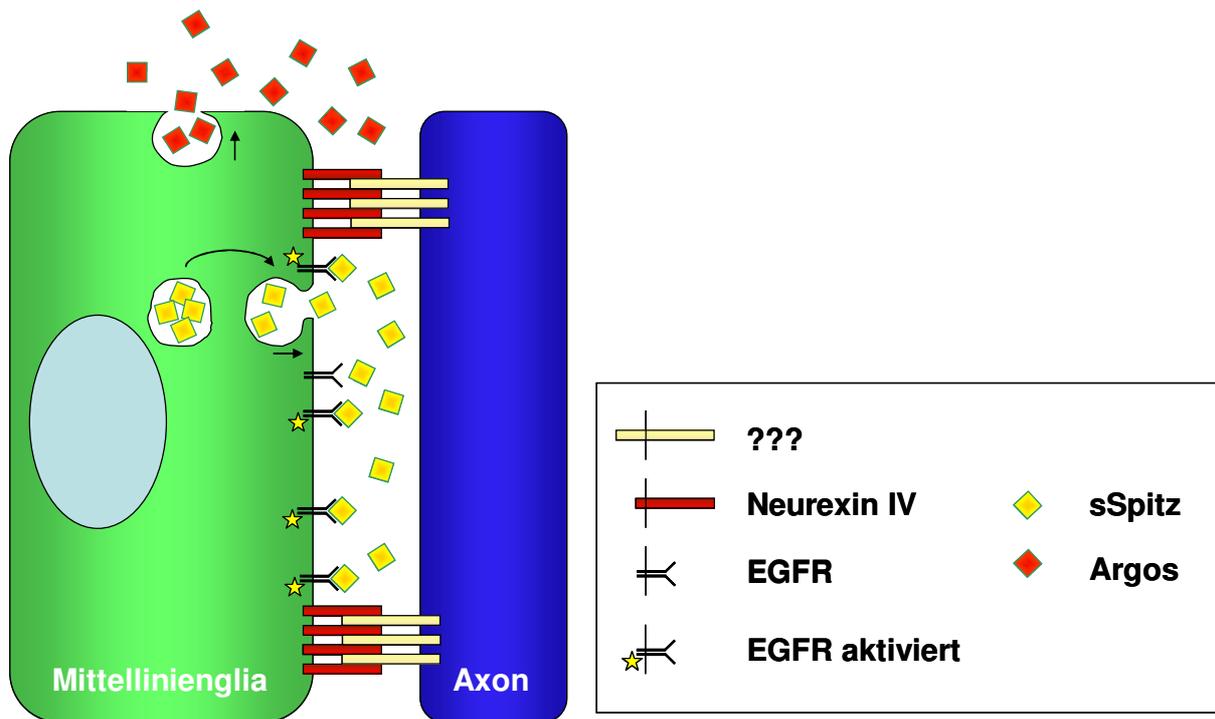
### **4.2.3.4 Rolle von Zell-Zell Kontakten in der trophischen Regulation der Mittellinienglia**

Das Überleben der Mittellinienglia wird durch das trophische Signal Spitz über den EGF-Rezeptor Signalweg gesteuert. Dabei ist das Überleben der Mittellinienglia vom engen Kontakt mit den kommissuralen Axonen abhängig.

Spitz wird initial als ein inaktives Transmembranprotein synthetisiert und muss prozessiert werden, um als aktiver Ligand sezerniert zu werden. An diesem Prozess sind die beiden Gene Star und Rhomboid-1 essentiell beteiligt (Klämmt, 2002; Lee et al., 2001; Tsruya et al., 2002). Diese aktive, sezernierte Form von Spitz (sSpitz) kann nun als Ligand für den EGF-Rezeptor fungieren. Nach einem aktuellen Model wird Spitz von kommissuralen Axonen in geringen Mengen produziert und führt so zum Überleben der Mittellinienglia, die in engem Kontakt mit den Axonen stehen (Bergmann et al., 2002).

Neben Spitz spielt Argos, ein sekretierter Antagonist des EGF-Rezeptors, eine entscheidende Rolle in der Regulation der Anzahl der Mittellinienglia (Jin et al., 2000; Schweitzer et al., 1995a; Schweitzer et al., 1995b). Die Mittellinienglia, die durch engen Axonkontakt eine starke EGFR Aktivität haben, sezernieren Argos, um überzählige Mittellinienglia, mit nur schwachem Axonkontakt in die Apoptose zu treiben (Stemerdink and Jacobs, 1997). Möglicherweise kommt es durch Zellkontakte oder sogar der Ausbildung von Septate Junctions zwischen Mittellinienglia und Axonen zu einem Ausschluss von Argos, so dass es nicht auf die sezernierende Zelle selbst wirken kann (Abb. D5, (Jacobs, 2000; Stemerdink and Jacobs, 1997)).

Da z.B. Rhomboid in Mittellinienglia stark exprimiert ist, wäre es auch möglich, dass das trophische Spitz Signal von den Mittellinienglia selbst sezerniert wird. Es könnte durch eine lokale Sezernierung und durch Zell-Zell Kontakte mit Axonen wie z.B. Septate Junctions an den Kontaktstellen konzentriert werden und so autokrin für eine starke Aktivierung des EGF-Rezeptors sorgen (Abb. D5).



**Abb. D5: Autokrines Modell der Funktion von Septate Junctions in der Entwicklung der Mittellinienglia.** Neurexin IV könnte durch Bindung eines unbekanntes Bindungspartners in den Axonen die Ausbildung von Septate Junctions vermitteln. Argos und Spitz werden in unterschiedlichen Membrandomänen sekretiert. Durch Septate Junctions kommt es zum einen zu einem Ausschluss von Argos und zum anderen zu einer Konzentration von Spitz. Dies führt zu einer autokrinen Aktivierung des EGF Rezeptors und zum Überleben der Gliazellen, die starken Axonkontakt haben.

#### 4.2.4 *in vivo* Analyse der Mittellinienglia Entwicklung

Um eine *in vivo* Analyse der Mittellinienglia Entwicklung zu ermöglichen, wurden mit Hilfe des *slit*-Gal4 Treibers verschiedene fluoreszente Proteine in den Mittellinienglia exprimiert und deren Eignung für eine *in vivo* Beobachtung beurteilt. Dabei zeigte eine UAS *tau*-GFP Insertion die beste Markierung der Mittellinienglia Morphologie. Mit Hilfe einer *slit*-Gal4 UAS *tau*-GFP Rekombinante konnte gezeigt werden, dass *in vivo* Analysen der Mittellinienglia Entwicklung möglich sind. Erschwert wurden die Analysen durch 1. die Lage der Mittellinienglia weit im Inneren des Embryos 2. die schlechten optischen Eigenschaften lebender Embryonen 3. eine schwache Fluoreszenz in frühen Stadien aufgrund der Reifung des GFP Proteins 4. Expression des *slit*-Gal4 Treibers in anderen Geweben (z.B. Muskeln) in späten Stadien 5. Muskelkontraktionen in späten Stadien und 6. die Fluoreszenz in Makrophagen.

Das Problem der verzögerten GFP Fluoreszenz ließe sich vielleicht durch die Verwendung eines anderen fluoreszenten Proteins lösen. So ist seit kurzem ein monomeres, grün fluoreszierendes Protein, das aus dem Ruderfusskreb (Copepod)

## Diskussion

*Pentellina plumata* isoliert wurde, kommerziell erhältlich (Shagin et al., 2004). Dieses CopGFP oder dessen Derivat TurboGFP zeigen eine deutlich frühere Fluoreszenz und sollen sich besonders bei Tieren mit niedriger Körpertemperatur gut einsetzen lassen (Evrogen). Bisher gibt es keine Referenzen für den Einsatz von CopGFP in *Drosophila*, jedoch könnte dieses Protein einen entscheidenden Vorteil bei der Visualisierung der frühen Prozesse der Mittellinienglia bieten.

Die störende Expression in Muskeln, Mittellinienneuronen und unter Umständen Makrophagen (siehe unten) könnte eventuell durch die Verwendung eines anderen Treibers gelöst werden. So ist im Labor eine Gal4 Linie vorhanden (Lammel, unveröffentlicht), die nach ersten Analysen zwar schwächer als *slit*-Gal4 in den Mittellinienglia exprimiert, dafür aber spezifischer. Weitere Analysen müssen zeigen, ob sich dieser Treiber eventuell eignet um z.B. späte Stadien *in vivo* zu analysieren.

Ein Problem bei der Aufnahme von späten Stadien sind Muskelkontraktionen. Im Stadium 16 kann die erste Darmperistaltik beobachtet werden, später treten auch Kontraktionen in den somatischen Muskeln auf. Diese könnten durch eine Injektion von Kaliumcyanid unterbunden werden (Schwabe et al., 2005).

Ein weiteres generelles Problem ist eine deutliche Fluoreszenz in Makrophagen. Bisher ist unklar, ob diese Fluoreszenz durch die Aktivität des *slit*-Gal4 Treibers entsteht oder ob die Makrophagen bei der Phagozytose von apoptotischen Gliazellen das GFP aufnehmen und so markiert werden. Diese Frage könnte geklärt werden, indem die Apoptose in den Mittelliniengliazellen durch die Koexpression des antiapoptotischen Proteins P35 unterbunden wird. Falls die Fluoreszenz in den Makrophagen durch die Aktivität des *slit*-Gal4 Treibers direkt entsteht, könnte ein alternativer Gal4 Treiber eingesetzt werden.

Ein besonderes Ziel wäre es, die Aufnahmetechniken so zu verbessern (z.B. durch *two-photon*-Mikroskopie, (So et al., 2000)), dass sich die Umhüllung der Axone durch die Mittellinienglia in den Kommissuren filmen ließe.

### 4.2.4.1 Interaktion von Mittellinienglia mit Makrophagen

Die apikalen Zellausläufer der Mittellinienglia werden in der Embryonalentwicklung zurückgebildet. In einer ersten *in vivo* Analyse konnte eine enge Assoziation von Makrophagen mit den apikalen Ausläufern der Mittellinienglia beobachtet werden. Bisher ist nicht bekannt, ob alle Mittellinienglia zu diesem Zeitpunkt apikale Ausläufer haben und welche Funktion diese Strukturen haben könnten. Die Analyse der *in vivo*

## Diskussion

Aufnahme lässt vermuten, dass Makrophagen eine unterstützende Funktion bei der Rückbildung der Ausläufer haben könnten.

Makrophagen können apoptotische Zellkörper im ZNS phagozytieren und sie so entfernen (Franc et al., 1999; Sonnenfeld and Jacobs, 1995b). Dieser Prozess ist für die Ausbildung einer normalen Morphologie des ZNS essentiell. In Mutanten, die keine Hämocyten ausbilden, kommt es zu milden ZNS Defekten (Olofsson and Page, 2005; Sears et al., 2003). Die apoptotischen Zellen werden weniger effektiv entfernt und die verbleibenden Zellreste stören die Ausbildung des Axonmusters und die korrekte Positionierung der lateralen Gliazellen (Sears et al., 2003).

Es wäre möglich, dass die Ausläufer der Mittellinienglia über einen phagozytotischen Mechanismus entfernt werden. Über eine Analyse von Mutanten, die keine Hämocyten bilden (*serpent*<sup>neo45</sup> (Rehorn et al., 1996)) oder in denen die Phagozytose gestört ist (*croquemort* (Franc et al., 1999)), könnte die Rolle der Makrophagen in der Rückbildung der apikalen Zellausläufer und der weiteren Differenzierung der Mittellinienglia studiert werden.

### 4.2.5 Test zur Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke

Da bisher nur vergleichsweise aufwendige Methoden existieren, um die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke zu testen, sollte in dieser Arbeit ein GFP basierter Reporter konstruiert werden.

Dazu wurde der Metallothionein A Promotor verwendet. Es konnte bisher gezeigt werden, dass das MT-GFP Konstrukt in den Fliegen prinzipiell funktionell ist und sich durch die Injektion oder Fütterung von Cu<sup>2+</sup>-Ionen induzieren lässt. Besonders durch Injektion konnte in vielen Geweben eine starke Expression induziert werden. Durch die Fütterung mit hohen Cu<sup>2+</sup>-Konzentrationen konnte zwar auch eine Induktion erreicht werden, diese war aber vor allem im Darm zu beobachten, während sich in den übrigen Geweben kaum Expression induzieren ließ. Die hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass im Darm die detoxifizierenden Metallothionein Proteine MtnA und MtnB induziert werden. Diese können Kupferionen komplexieren und so die Konzentration in der Hämolymphe niedrig halten (Bonneton et al., 1996; Lange et al., 1990).

Durch Injektion können direkt hohe Cu<sup>2+</sup>-Konzentrationen in der Hämolymphe eingestellt werden. Die Induktion des GFP Signals war hier deutlich breiter, aber auch nicht vollständig ubiquitär. So wurde z.B. in der Epidermis kein GFP Signal

## Diskussion

induziert. Im ZNS zeigten nur ein Teil der Gliazellen Expression, während in Neuronen keine Induktion stattfand. Dies könnte entweder damit zusammenhängen, dass die Blut-Hirn-Schranke intakt ist und so keine  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu den Neuronen gelangen oder dass sich der *mtnA* Promotor generell nicht in Neuronen induzieren lässt. Um dies zu testen, werden in Zukunft Mutanten mit defekter Blut-Hirn-Schranke, wie z.B. *neurexin*, *glial cells missing* oder *loco*, auf eine Induzierbarkeit des Reporterkonstruktes in Neuronen getestet werden.

Die Expression der *metallothionein* Gene *A* und *B* ist abhängig vom Transkriptionsfaktor MTF-1 (Balamurugan et al., 2004; Selvaraj et al., 2005). Bisher wurde nicht gezeigt, dass MTF-1 im Nervensystem exprimiert ist. Allerdings lässt sich in einigen Gliazellen durchaus ein GFP Signal induzieren. Bei diesen Gliazellen handelt es sich um Subperineurial- und Neuropilglia. Es wäre möglich, dass die Blut-Hirn-Schranke durchlässig für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen ist und nur Gliazellen eine Induktion des Reporters zeigen, weil sie im Gegensatz zu den Neuronen MTF-1 positiv sind. Dies würde darauf hindeuten, dass die Gliazellen eine detoxifizierende Rolle für das ZNS spielen können, indem sie Metallothioneine hochregulieren.

Eine andere Erklärung wäre, dass nur die Gliazellen in Kontakt mit hohen  $\text{Cu}^{2+}$  Konzentrationen kommen. Allerdings zeigen auch zentral im ZNS liegende Gliazellen eine Induktion. Für Gliazellen in Insekten sind Gap-Junctions beschrieben, die einen Austausch von Metaboliten und Ionen ermöglichen (Carlson and Saint Marie, 1990). Auch für die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen wäre denkbar, dass sie von Gliazellen aufgenommen und dann zwischen den Zellen ausgetauscht werden könnten.

Falls sich zeigt, dass sich in Mutanten mit defekter Blut-Hirn-Schranke eine Expression des Reporters in Neuronen induzieren ließe, könnte das MT-GFP Konstrukt zur einfachen Überprüfung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke eingesetzt werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die komplexe genetische Situation des  $\alpha$ -*spectrin/CG32315* Locus aufgeklärt werden. Es zeigte sich, dass es sich bei dem Gen *CG32315*, das im ersten Intron von  $\alpha$ -*spectrin* liegt, um *discs lost* handelt. Dieses Gen codiert das Drosophila Homolog des menschlichen *codanin-1*. Es fungiert zellautonom als Überlebensfaktor und hat möglicherweise eine Funktion beim Durchlaufen der G1- und der S-Phase des Zellzyklus.

In dieser Arbeit konnten publizierte Daten, welche die *discs lost* Mutationen auf das Gen *patj* kartierten und die für *discs lost* Allele Defekte in der epithelialen Zellpolarität beschrieben, widerlegt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *klötzchen* Mutationen  $\alpha$ -*spectrin* betreffen. Der *klötzchen* Phänotyp, der durch einen Verlust der polaren Organisation der Mittellinienglia gekennzeichnet ist, stellte sich als kältesensitiv heraus.

Es wurden 22 neue  $\alpha$ -*spectrin* Allele generiert, von denen einige wahrscheinlich Mutationen in einzelnen funktionellen Domänen tragen. Die Analyse dieser Mutanten kann in Zukunft zu einem besseren Verständnis der Funktion von  $\alpha$ -Spectrin beitragen.

In der Analyse der Mittellinienglia Entwicklung konnte gezeigt werden, dass Neurexin für die terminale Differenzierung von axonumhüllenden Fortsätzen benötigt wird. Es ergaben sich damit Hinweise auf eine mögliche Funktion von pleated Septate Junctions in späten Stadien der Entwicklung der Mittellinienglia. Die genetische Analyse weiterer Septate Junction Determinanten und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellkontakte der Mittellinienglia werden zeigen, ob Septate Junctions in Mittellinienglia ausgebildet werden und ob sich diese in ihrer Zusammensetzung von den Septate Junctions der primären Epithelien unterscheiden.

Für pleated Septate Junctions ist bekannt, dass sie für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke benötigt werden. Um die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen, wurde ein Schwermetall-induzierbares Reporterkonstrukt generiert. Erste Versuche belegen die Funktionalität des MT-EGFP Konstrukts. Weitere Versuche müssen zeigen, ob es sich für die Analyse der Blut-Hirn-Schranke einsetzen lässt.

## 6. Literatur

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.
- Akiyama, Y., Hosoya, T., Poole, A. M. and Hotta, Y.** (1996). The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14912-6.
- Asano, M., Nevins, J. R. and Wharton, R. P.** (1996). Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **10**, 1422-32.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*, a laboratory handbook: CSHL press.
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K. and Goodman, C. S.** (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell* **81**, 757-67.
- Awasaki, T. and Ito, K.** (2004). Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Curr Biol* **14**, 668-77.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E.** (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-43.
- Balamurugan, K., Egli, D., Selvaraj, A., Zhang, B., Georgiev, O. and Schaffner, W.** (2004). Metal-responsive transcription factor (MTF-1) and heavy metal stress response in *Drosophila* and mammalian cells: a functional comparison. *Biol Chem* **385**, 597-603.
- Bao, S. and Cagan, R.** (2005). Preferential adhesion mediated by Hibris and Roughest regulates morphogenesis and patterning in the *Drosophila* eye. *Dev Cell* **8**, 925-35.
- Barolo, S., Castro, B. and Posakony, J. W.** (2004). New *Drosophila* transgenic reporters: insulated P-element vectors expressing fast-maturing RFP. *Biotechniques* **36**, 436-40, 442.
- Bashaw, G. J. and Goodman, C. S.** (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* **97**, 917-26.
- Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H. J.** (1996). A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* **87**, 1059-68.
- Beatus, P. and Lendahl, U.** (1998). Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res* **54**, 125-36.
- Behr, M., Riedel, D. and Schuh, R.** (2003). The claudin-like megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev Cell* **5**, 611-20.
- Bellen, H. J., Lu, Y., Beckstead, R. and Bhat, M. A.** (1998). Neurexin IV, caspr and paranodin--novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia. *Trends Neurosci* **21**, 444-9.
- Bennett, V.** (1989). The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* **988**, 107-21.
- Bennett, V. and Baines, A. J.** (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* **81**, 1353-92.

- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z. and Steller, H.** (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell* **2**, 159-70.
- Betschinger, J., Mechtler, K. and Knoblich, J. A.** (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-30.
- Bhat, K. M.** (2005). SLIT-ROBO signaling neutralizes Netrin-Frazzled mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics*.
- Bhat, M. A.** (2003). Molecular organization of axo-glial junctions. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 552-9.
- Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. and Bellen, H. J.** (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity.[erratum appears in Cell. 2003 Dec 12;115(6):765-6]. *Cell* **96**, 833-45.
- Bialkowska, K., Saïdo, T. C. and Fox, J. E.** (2005). SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin signaling complexes. *J Cell Sci* **118**, 381-95.
- Bier, E.** (1997). Anti-neural-inhibition: A conserved mechanism for neural induction. *Cell* **89**, 681-684.
- Bier, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1990). *rhomboid*, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **4**, 190-203.
- Bilder, D.** (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **18**, 1909-25.
- Bilder, D., Li, M. and Perrimon, N.** (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**, 113-6.
- Bogdan, S. and Klämbt, C.** (2003). Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* **130**, 4427-37.
- Bonneton, F., Theodore, L., Silar, P., Maroni, G. and Wegnez, M.** (1996). Response of *Drosophila* metallothionein promoters to metallic, heat shock and oxidative stresses. *FEBS Lett* **380**, 33-8.
- Booth, G. E., Kinrade, E. F. and Hidalgo, A.** (2000). Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development* **127**, 237-44.
- Bossing, T. and Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labeling. *Development* **120**, 1895-1906.
- Bossing, T., Technau, G. M. and Doe, C. Q.** (1996a). huckebein is required for glial development and axon pathfinding in the neuroblast 1 1 and neuroblast 2 2 lineages in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **55**, 53-64.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M.** (1996b). 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.
- Boyle, M. E., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L., Peles, E. and Ranscht, B.** (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* **30**, 385-97.
- Brand, A.** (1999). GFP as a cell and developmental marker in the *Drosophila* nervous system. *Methods Cell Biol* **58**, 165-81.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.

- Bray, S.** (1998). Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 591-7.
- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klämbt, C.** (1994). The ETS domain protein pointed P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* **370**, 386-9.
- Bunch, T. A., Grinblat, Y. and Goldstein, L. S.** (1988). Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1043-61.
- Byers, T. J., Dubreuil, R., Branton, D., Kiehart, D. P. and Goldstein, L. S.** (1987). *Drosophila* spectrin. II. Conserved features of the alpha-subunit are revealed by analysis of cDNA clones and fusion proteins. *J Cell Biol* **105**, 2103-10.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. and Tsien, R. Y.** (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7877-82.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Carlson, S. D. and Hilgers, S. L.** (1998). Perineurium in the *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) embryo and its role in the blood-brain/nerve Barrier. *Int J Insect Morphol. Embryol.* **27**, 61-66.
- Carlson, S. D., Juang, J. L., Hilgers, S. L. and Garment, M. B.** (2000). Blood barriers of the insect. *Annu Rev Entomol* **45**, 151-74.
- Carlson, S. D. and Saint Marie, R. L.** (1990). Structure and function of insect glia. *Annu. Rev. Entomol.* **35**, 597-621.
- Carthew, R. W.** (2005). Adhesion proteins and the control of cell shape. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 358-63.
- Chou, T. B., Noll, E. and Perrimon, N.** (1993). Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* **119**, 1359-1369.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.
- Chou, T.-Z. and Perrimon, N.** (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643-653.
- Cohen, S. M.** (1993). Imaginal disc Development. In *The Development of Drosophila melanogaster*, (ed. C. M. Bate and A. Martinez Arias).
- Crews, S. T., Thomas, J. B. and Goodman, C. S.** (1988). The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* **52**, 143-151.
- Cutforth, T. and Rubin, G. M.** (1994). Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell* **77**, 1027-36.
- de Cuevas, M., Lee, J. K. and Spradling, A. C.** (1996). alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development* **122**, 3959-68.
- De Matteis, M. A. and Morrow, J. S.** (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* **113**, 2331-43.
- Deng, H., Lee, J. K., Goldstein, L. S. and Branton, D.** (1995). *Drosophila* development requires spectrin network formation. *J Cell Biol* **128**, 71-9.
- Dent, E. W. and Gertler, F. B.** (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**, 209-27.
- Dgany, O., Avidan, N., Delaunay, J., Krasnov, T., Shalmon, L., Shalev, H., Eidelitz-Markus, T., Kapelushnik, J., Cattani, D., Pariente, A. et al.** (2002).

- Congenital dyserythropoietic anemia type I is caused by mutations in codanin-1. *Am J Hum Genet* **71**, 1467-74.
- Diaz, B. and Moreno, E.** (2005). The competitive nature of cells. *Exp Cell Res* **306**, 317-22.
- Dienemann, A. and Sprenger, F.** (2004). Requirements of cyclin a for mitosis are independent of its subcellular localization. *Curr Biol* **14**, 1117-23.
- Djiane, A., Yogev, S. and Mlodzik, M.** (2005). The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Cell* **121**, 621-31.
- Doe, C. Q.** (2001). Cell polarity: the PARty expands. *Nat Cell Biol* **3**, E7-9.
- Dubreuil, R. R. and Grushko, T.** (1998). Genetic studies of spectrin: new life for a ghost protein. *Bioessays* **20**, 875-8.
- Dubreuil, R. R. and Grushko, T.** (1999). Neuroglian and DE-cadherin activate independent cytoskeleton assembly pathways in *Drosophila* S2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 372-5.
- Dubreuil, R. R., MacVicar, G., Dissanayake, S., Liu, C., Homer, D. and Hortsch, M.** (1996). Neuroglian mediated cell adhesion induces assembly of the membrane skeleton at cell contact sites. *J Cell Biol* **133**, 647-55.
- Dubreuil, R. R., Maddux, P. B., Grushko, T. A. and MacVicar, G. R.** (1997). Segregation of two spectrin isoforms: polarized membrane-binding sites direct polarized membrane skeleton assembly. *Mol Biol Cell* **8**, 1933-42.
- Dubreuil, R. R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J. and Goldstein, L. S.** (2000). *Drosophila* beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells. *J Cell Biol* **149**, 647-56.
- Dubreuil, R. R. and Yu, J.** (1994). Ankyrin and beta-spectrin accumulate independently of alpha-spectrin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10285-9.
- Edenfeld, G.** (2004). Die Entwicklung der peripheren Gliazellen von *Drosophila melanogaster*, Dissertation, Universität Münster.
- Edenfeld, G., Pielage, J. and Klämbt, C.** (2002). Cell lineage specification in the nervous system. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 473-7.
- Edenfeld, G., Stork, T. and Klämbt, C.** (2005). Neuron-glia interaction in the insect nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 34-9.
- Edwards, J. S., Swales, L. S. and Bate, M.** (1993). The differentiation between neuroglia and connective tissue sheath in insect ganglia revisited: the neural lamella and perineurial sheath cells are absent in a mesodermless mutant of *Drosophila*. *J Comp Neurol* **333**, 301-8.
- Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U. and Reichert, H.** (2002). Gliogenesis in *Drosophila*: genome-wide analysis of downstream genes of glial cells missing in the embryonic nervous system. *Development* **129**, 3295-309.
- Einheber, S., Zanazzi, G., Ching, W., Scherer, S., Milner, T. A., Peles, E. and Salzer, J. L.** (1997). The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol* **139**, 1495-506.
- Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M. and Bhat, M. A.** (2004). *Drosophila* contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development* **131**, 4931-42.
- Fanara, J. J., Robinson, K. O., Rollmann, S. M., Anholt, R. R. and Mackay, T. F.** (2002). Vanaso is a candidate quantitative trait gene for *Drosophila* olfactory behavior. *Genetics* **162**, 1321-8.

- Featherstone, D. E., Davis, W. S., Dubreuil, R. R. and Broadie, K.** (2001). Drosophila alpha- and beta-spectrin mutations disrupt presynaptic neurotransmitter release. *J Neurosci* **21**, 4215-24.
- Fehon, R. G., Dawson, I. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1994). A Drosophila homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development* **120**, 545-57.
- Ferrus, A.** (1975). Parameters of mitotic recombination in minute mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **79**, 589-99.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fleit, H. B., Lane, A. P., Watson, T. J., Kuhnle, M. and Lane, B. P.** (1987). Fc-mediated endocytosis by human neutrophils. Ultrastructural studies. *Lab Invest* **57**, 699-707.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. and White, K.** (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**, 1991-4.
- Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J. and Bier, E.** (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev* **8**, 2602-16.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. and Doe, C. Q.** (2003). Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**, 567-80.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.
- Genova, J. L. and Fehon, R. G.** (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J Cell Biol* **161**, 979-89.
- Gertler, F. B., Bennett, R. L., M.J., C. and Hoffmann, F. M.** (1989). *Drosophila* abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: A role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell* **58**, 103-113. .
- Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. and Klämbt, C.** (1997). Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. *Development* **124**, 2307-16.
- Giesen, K., Lammel, U., Langehans, D., Krukkert, K., Bunse, I. and Klämbt, C.** (2003). Regulation of glial cell number and differentiation by ecdysone and Fos signaling. *Mech Dev* **120**, 401-13.
- Giniger, E.** (1998). A role for Abl in Notch signaling. *Neuron* **20**, 667-81.
- Gonzalez-Gaitan, M.** (2003). Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 213-24.
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q.** (1993). Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system: CSH press.
- Goyal, L.** (2001). Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* **104**, 805-8.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. and Steller, H.** (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* **19**, 589-97.
- Granderath, S., Bunse, I. and Klämbt, C.** (2000). gcm and pointed synergistically control glial transcription of the *Drosophila* gene loco. *Mech Dev* **91**, 197-208.

- Granderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C. S., O'Kane, C. J. and Klämbt, C.** (1999). *loco* encodes an RGS protein required for Drosophila glial differentiation. *Development* **126**, 1781-91.
- Grewal, S. S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R. N. and Edgar, B. A.** (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development. *Nat Cell Biol* **7**, 295-302.
- Grosskortenhaus, R. and Sprenger, F.** (2002). Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev Cell* **2**, 29-40.
- Grzeschik, N. A. and Knust, E.** (2005). IrreC/rst-mediated cell sorting during Drosophila pupal eye development depends on proper localisation of DE-cadherin. *Development* **132**, 2035-45.
- Gunsalus, K. C. and Piano, F.** (2005). RNAi as a tool to study cell biology: building the genome-phenome bridge. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 3-8.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. and Technau, G. M.** (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of Drosophila melanogaster. *Development* **121**, 317-332.
- Hammarlund, M., Davis, W. S. and Jorgensen, E. M.** (2000). Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *J Cell Biol* **149**, 931-42.
- Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A.** (1996). Guidance cues at the Drosophila midline: Identification and characterization of two Drosophila netrin/*unc6* homologs. *Neuron* **17**, 217-228.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. *Development* **120**, 2121-9.
- Hayashi, T. and Carthew, R. W.** (2004). Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* **431**, 647-52.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P.** (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila. *Development* **122**, 161-71.
- Heitzler, P. and Simpson, P.** (1991). The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. *Cell* **64**, 1083-92.
- Hidalgo, A. and Brand, A. H.** (1997). Targeted neuronal ablation: the role of pioneer neurons in guidance and fasciculation in the CNS of Drosophila. *Development* **124**, 3253-62.
- Hidalgo, A. and French-Constant, C.** (2003). The control of cell number during central nervous system development in flies and mice. *Mech Dev* **120**, 1311-25.
- Hidalgo, A., Kinrade, E. F. and Georgiou, M.** (2001). The Drosophila neuregulin vein maintains glial survival during axon guidance in the CNS. *Dev Cell* **1**, 679-90.
- Hidalgo, A., Urban, J. and Brand, A. H.** (1995). Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the Drosophila CNS. *Development* **121**, 3702-3712.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634-8.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y.** (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in Drosophila. *Cell* **82**, 1025-36.
- Hoyle, G.** (1952). High blood potassium in insects in relation to nerve conduction. *Nature* **169**, 281-2.
- Hoyle, G.** (1986). Glial cells of an insect ganglion. *J Comp Neurol* **246**, 85-103.

- Hülsmeier, J.** (2005). Die Analyse des *karussell* Gens in *Drosophila melanogaster*, Dissertation, Universität Münster.
- Hummel, T., Attix, S., Gunning, D. and Zipursky, S. L.** (2002). Temporal control of glial cell migration in the *Drosophila* eye requires *gilgamesh*, *hedgehog*, and eye specification genes. *Neuron* **33**, 193-203.
- Hummel, T., Leifker, K. and Klämbt, C.** (2000). The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog *KETTE* controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization. *Genes Dev* **14**, 863-73.
- Hummel, T., Menne, T., Scholz, H., Granderath, S., Giesen, K. and Klämbt, C.** (1997a). CNS midline development in *Drosophila*. *Perspect Dev Neurobiol* **4**, 357-68.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1997b). Fast and efficient egg collection and antibody staining from large numbers of *Drosophila* strains. *DEG* **207**, 131-135.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999a). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila* : I Identification of the required gene functions. *Dev. Biol.* **209**, 381-398.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999b). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila* : II Function of the different midline cells. *Development* **126**, 771-779.
- Hummel, T., Vasconcelos, M. L., Clemens, J. C., Fishilevich, Y., Vosshall, L. B. and Zipursky, S. L.** (2003). Axonal targeting of olfactory receptor neurons in *Drosophila* is controlled by *Dscam*. *Neuron* **37**, 221-31.
- Ito, K., Urban, J. and Technau, G. M.** (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells during late embryogenesis. *Roux's Arch Dev Biol.* **204**, 284-307.
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K. W.** (2002). *Drosophila* *Crumbs* is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178-83.
- Jacobs, J. R.** (2000). The midline glia of *Drosophila*: a molecular genetic model for the developmental functions of glia. *Prog Neurobiol* **62**, 475-508.
- Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1989). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J Neurosci* **9**, 2412-22.
- Jiao, R., Daube, M., Duan, H., Zou, Y., Frei, E. and Noll, M.** (2001). Headless flies generated by developmental pathway interference. *Development* **128**, 3307-19.
- Jin, M. H., Sawamoto, K., Ito, M. and Okano, H.** (2000). The interaction between the *Drosophila* secreted protein *argos* and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted *spitz* to the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 2098-107.
- Johansen, J. and Johansen, K. M.** (1997). Molecular mechanisms mediating axon pathway formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **7**, 95-116.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N. and Gallant, P.** (1999). *Drosophila* *myc* regulates cellular growth during development. *Cell* **98**, 779-90.
- Jones, B. W.** (2001). Glial cell development in the *Drosophila* embryo. *Bioessays* **23**, 877-87.
- Jones, B. W.** (2005). Transcriptional control of glial cell development in *Drosophila*. *Dev Biol* **278**, 265-73.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S.** (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013-23.

- Juang, J. L. and Carlson, S. D.** (1994). Analog of vertebrate anionic sites in blood-brain interface of larval *Drosophila*. *Cell Tissue Res* **277**, 87-95.
- Kammerer, M. and Giangrande, A.** (2001). *Glide2*, a second glial promoting factor in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **20**, 4664-73.
- Katzen, A. L., Jackson, J., Harmon, B. P., Fung, S. M., Ramsay, G. and Bishop, J. M.** (1998). *Drosophila myb* is required for the G2/M transition and maintenance of diploidy. *Genes Dev* **12**, 831-43.
- Kearney, J. B., Wheeler, S. R., Estes, P., Parente, B. and Crews, S. T.** (2004). Gene expression profiling of the developing *Drosophila* CNS midline cells. *Dev Biol* **275**, 473-92.
- Keleman, K., Ribeiro, C. and Dickson, B. J.** (2005). Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 156-63.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Kidd, S., Lieber, T. and Young, M. W.** (1998). Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes Dev* **12**, 3728-40.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* **96**, 785-94.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. and Klämbt, C.** (1994). The *Ets* transcription factors encoded by the *Drosophila* gene *pointed* direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-60.
- Klämbt, C.** (1993). The *Drosophila* gene *pointed* encodes two ETS like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**, 163-76.
- Klämbt, C.** (2002). EGF receptor signalling: roles of star and rhomboid revealed. *Curr Biol* **12**, R21-3.
- Klämbt, C. and Goodman, C. S.** (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Glia* **4**, 205-13.
- Klämbt, C., Hummel, T., Menne, T., Sadlowski, E., Scholz, H. and Stollewerk, A.** (1996). Development and function of embryonic central nervous system glial cells in *Drosophila*. *Dev Genet* **18**, 40-9.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1991). The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**, 801-15.
- Klebes, A. and Knust, E.** (2000). A conserved motif in *Crumbs* is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 76-85.
- Knoblich, J. A. and Lehner, C. F.** (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *Embo J* **12**, 65-74.
- Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. and Lehner, C. F.** (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**, 107-20.
- Knust, E.** (2000). Control of epithelial cell shape and polarity. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 471-5.
- Koc, E. C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M. B., Schlatzer, D. M., Moseley, A. and Spremulli, L. L.** (2001). The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **276**, 43958-69.

- Koh, Y. H., Popova, E., Thomas, U., Griffith, L. C. and Budnik, V.** (1999). Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* **98**, 353-63.
- 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.
- Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M. and Arora, K.** (1991). Establishment of the mesoderm neuroectoderm boundary in the Drosophila embryo. *Science* **254**, 118-22.
- Kramer, H.** (2000). The ups and downs of life in an epithelium. *J Cell Biol* **151**, F15-8.
- Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L. and Fehon, R. G.** (1998). Drosophila coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol Biol Cell* **9**, 3505-19.
- Lambertsson, A.** (1998). The minute genes in Drosophila and their molecular functions. *Adv Genet* **38**, 69-134.
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F. and Vaessin, H.** (1996). Dacapo, a cyclin dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during Drosophila development. *Cell* **87**, 1225-35.
- Lange, B. W., Langley, C. H. and Stephan, W.** (1990). Molecular evolution of Drosophila metallothionein genes. *Genetics* **126**, 921-32.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M.** (2001). Postembryonic hematopoiesis in Drosophila. *Dev Biol* **230**, 243-57.
- Laski, F. A., Lio, D., Rubin. and G.** (1986). Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *C.* **44**, 7-19.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-9.
- Lee, J. K., Brandin, E., Branton, D. and Goldstein, L. S.** (1997). alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in Drosophila melanogaster. *Development* **124**, 353-62.
- Lee, J. K., Coyne, R. S., Dubreuil, R. R., Goldstein, L. S. and Branton, D.** (1993). Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of Drosophila melanogaster. *J Cell Biol* **123**, 1797-809.
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F. and Freeman, M.** (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in Drosophila. *Cell* **107**, 161-171.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W.** (2003). Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-9.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A.** (2002). hINADI/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 25408-15.
- Leptin, M.** (1991). twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development. *Genes & Dev.* **5**, 1568-1576.
- Lin, D. M. and Goodman, C. S.** (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507-23.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The genome of Drosophila melanogaster. In *Academic Press, Inc*, (ed).

- Llimargas, M., Strigini, M., Katidou, M., Karagogeos, D. and Casanova, J.** (2004). Lachesin is a component of a septate junction-based mechanism that controls tube size and epithelial integrity in the *Drosophila* tracheal system. *Development* **131**, 181-90.
- Lucchesi, J. C.** (1968). Synthetic lethality and semi-lethality among functionally related mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **59**, 37-44.
- Martin-Bermudo, M. D., Carmena, A. and Jimenez, F.** (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* **121**, 219-24.
- Martín-Bermudo, M. D., Carmena, A. and Jiménez, F.** (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* **121**, 219-224.
- Martin-Bermudo, M. D., Martinez, C., Rodriguez, A. and Jimenez, F.** (1991). Distribution and function of the lethal of scute gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **113**, 445-54.
- Marygold, S. J., Coelho, C. M. and Leever, S. J.** (2005). Genetic analysis of RpL38 and RpL5, two minute genes located in the centric heterochromatin of chromosome 2 of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **169**, 683-95.
- Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. and Le Bivic, A.** (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* **158**, 941-51.
- Menne, T. V. and Klämbt, C.** (1994). The formation of commissures in the *Drosophila* CNS depends on the midline cells and on the Notch gene. *Development* **120**, 123-33.
- Mergliano, J. and Minden, J. S.** (2003). Caspase-independent cell engulfment mirrors cell death pattern in *Drosophila* embryos. *Development* **130**, 5779-89.
- Michel, D., Arsanto, J. P., Massey-Harroche, D., Beclin, C., Wijnholds, J. and Le Bivic, A.** (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci* **118**, 4049-57.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-6.
- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J.** (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17**, 203-15.
- Mizuno, H., Sawano, A., Eli, P., Hama, H. and Miyawaki, A.** (2001). Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **40**, 2502-10.
- Morel, V. and Schweisguth, F.** (2000). Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **14**, 377-88.
- Moreno, E. and Basler, K.** (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-29.
- Mount, S. M. and Salz, H. K.** (2000). Pre-messenger RNA processing factors in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* **150**, F37-44.
- Müller, H. A. and Bossinger, O.** (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* **120**, 1231-56.
- Murray, M. J., Merritt, D. J., Brand, A. H. and Whittington, P. M.** (1998). In vivo dynamics of axon pathfinding in the *Drosophila* CNS: a time-lapse study of an identified motoneuron. *J Neurobiol* **37**, 607-21.

- Muskavitch, M. A.** (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* **166**, 415-30.
- Nam, S. C. and Choi, K. W.** (2003). Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in Drosophila. *Development* **130**, 4363-72.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S. and Crews, S. T.** (1990). The single minded gene of Drosophila is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* **63**, 63-75.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1991). The Drosophila single minded gene encodes a helix loop helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-67.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. and Edgar, B. A.** (1998a). Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. *Cell* **93**, 1183-93.
- Neufeld, T. P., Tang, A. H. and Rubin, G. M.** (1998b). A genetic screen to identify components of the sina signaling pathway in Drosophila eye development. *Genetics* **148**, 277-86.
- Newsome, T. P., Asling, B. and Dickson, B. J.** (2000). Analysis of Drosophila photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* **127**, 851-60.
- Noordermeer, J. N., 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.
- Oland, L. A. and Tolbert, L. P.** (2003). Key interactions between neurons and glial cells during neural development in insects. *Annu Rev Entomol* **48**, 89-110.
- Olofsson, B. and Page, D. T.** (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic Drosophila is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**, 233-43.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M.** (1994). The activities of two Ets related transcription factors required for Drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* **78**, 137-47.
- Osborn, M. and Weber, K.** (1976). Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 867-71.
- Paul, S. M., Ternet, M., Salvaterra, P. M. and Beitel, G. J.** (2003). The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase is required for septate junction function and epithelial tube-size control in the Drosophila tracheal system. *Development* **130**, 4963-74.
- Peitz, T.** (2005). Durchführung eines Piggybac-basierten Exon-trap-Versuches, (ed. **Peles, E., Joho, K., Plowman, G. D. and Schlessinger, J.** (1997). Close similarity between Drosophila neurexin IV and mammalian Caspr protein suggests a conserved mechanism for cellular interactions. *Cell* **88**, 745-6.
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U.** (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143-9.
- Pesacreta, T. C., Byers, T. J., Dubreuil, R., Kiehart, D. P. and Branton, D.** (1989). Drosophila spectrin: the membrane skeleton during embryogenesis. *J Cell Biol* **108**, 1697-709.
- Pielage, J.** (2002). Analyse von Neuron-Glia Interaktionen, Dissertation, Universität Münster.
- Pielage, J., Fetter, R. D. and Davis, G. W.** (2005). Presynaptic spectrin is essential for synapse stabilization. *Curr Biol* **15**, 918-28.

- Pielage, J., Kippert, A., Zhu, Z. and Klämbt, C.** (2004). The Drosophila transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. *Dev Biol* 2004 Nov 1;275(1):245-57.
- Pielage, J. and Klämbt, C.** (2001). Glial cells aid axonal target selection. *Trends Neurosci* **24**, 432-3.
- Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. and Klämbt, C.** (2003). The Drosophila cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev Cell* **5**, 841-51.
- Pinder, J. C. and Baines, A. J.** (2000). A protein accumulator. *Nature* **406**, 253-4.
- Poliak, S. and Peles, E.** (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* **4**, 968-80.
- Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J. and Dickson, B. J.** (2000a). Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* **28**, 767-77.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J.** (2000b). Selecting a Longitudinal Pathway: Robo Receptors Specify the Lateral Position of Axons in the Drosophila CNS. *Neuron* **28**, 767-777.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M. and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and Drosophila. *Development* **122**, 4023-31.
- Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z. and Fischbach, K. F.** (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the Drosophila retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development* **122**, 1931-40.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E.** (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res* **11**, 1114-25.
- Ribeiro, C., Neumann, M. and Affolter, M.** (2004). Genetic control of cell intercalation during tracheal morphogenesis in Drosophila. *Curr Biol* **14**, 2197-207.
- Rival, T., Soustelle, L., Strambi, C., Besson, M. T., Iche, M. and Birman, S.** (2004). Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the Drosophila brain. *Curr Biol* **14**, 599-605.
- Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2005). Regulation of membrane localization of Sanpodo by lethal giant larvae and neuralized in asymmetrically dividing cells of Drosophila sensory organs. *Mol Biol Cell* **16**, 3480-7.
- Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. and Margolis, B.** (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* **157**, 161-72.
- Rorth, P.** (1996). A modular misexpression screen in Drosophila detecting tissue specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12418-22.
- Rosenbluth, J., Liang, W. L., Liu, Z., Guo, D. and Schiff, R.** (1995). Paranodal structural abnormalities in rat CNS myelin developing in vivo in the presence of implanted O1 hybridoma cells. *J Neurocytol* **24**, 818-24.
- Rosler, W., Oland, L. A., Higgins, M. R., Hildebrand, J. G. and Tolbert, L. P.** (1999). Development of a glia-rich axon-sorting zone in the olfactory pathway of the moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* **19**, 9865-77.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15.
- Sadlowski, E.** (1995). Ektopische Expression von Genen in verschiedenen Mittellinienzellen des embryonalen ZNS von *Drosophila melanogaster* mit Hilfe der GAL4-Methode, Diplomarbeit, Universität Köln.

- Schimmelpfeng, K., Gogel, S. and Klämbt, C.** (2001). The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech Dev* **106**, 25-36.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of Drosophila embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A. and Klämbt, C.** (1997). Control of midline glia development in the embryonic Drosophila CNS. *Mech Dev* **62**, 79-91.
- Schonbaum, C. P., Organ, E. L., Qu, S. and Cavener, D. R.** (1992). The Drosophila melanogaster stranded at second (sas) gene encodes a putative epidermal cell surface receptor required for larval development. *Dev Biol* **151**, 431-45.
- Schreiber, J., Enderich, J. and Wegner, M.** (1998). Structural requirements for DNA binding of GCM proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 2337-43.
- Schulte, J., Tepass, U. and Auld, V. J.** (2003). Gliotactin, a novel marker of tricellular junctions, is necessary for septate junction development in Drosophila. *J Cell Biol* **161**, 991-1000.
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U. and Gaul, U.** (2005). GPCR Signaling Is Required for Blood-Brain Barrier Formation in Drosophila. *Cell* **123**, 133-44.
- Schweitzer, R., Howes, R., Smith, R., Shilo, B. Z. and Freeman, M.** (1995a). Inhibition of Drosophila EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature* **376**, 699-702.
- Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R. and Shilo, B. Z.** (1995b). Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev* **9**, 1518-29.
- Sears, H. C., Kennedy, C. J. and Garrity, P. A.** (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal Drosophila CNS morphogenesis. *Development* **130**, 3557-65.
- Selvaraj, A., Balamurugan, K., Yepiskoposyan, H., Zhou, H., Egli, D., Georgiev, O., Thiele, D. J. and Schaffner, W.** (2005). Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev* **19**, 891-6.
- 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**, 1001-14.
- Shagin, D. A., Barsova, E. V., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Labas, Y. A., Semenova, T. N., Ugalde, J. A., Meyers, A., Nunez, J. M. et al.** (2004). GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol* **21**, 841-50.
- Shearn, A. and Garen, A.** (1974). Genetic control of imaginal disc development in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1393-7.
- Shearn, A., Rice, T., Garen, A. and Gehring, W.** (1971). Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2594-8.
- Shimizu, M., Hiroaki, H., Kohda, D., Hosoya, T., Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Morita, E. H. and Morikawa, K.** (2003). NMR and ICP spectroscopic analysis of the

- DNA-binding domain of the Drosophila GCM protein reveals a novel Zn<sup>2+</sup>-binding motif. *Protein Eng* **16**, 247-54.
- Shin, K., Straight, S. and Margolis, B.** (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* **168**, 705-11.
- 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**, 1019-32.
- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (2000b). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* **28**, 753-766.
- Simpson, P.** (1979). Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of Drosophila. *Dev Biol* **69**, 182-93.
- Simpson, P. and Morata, G.** (1981). Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the Drosophila wing. *Dev Biol* **85**, 299-308.
- Sisson, J. C., Field, C., Ventura, R., Royou, A. and Sullivan, W.** (2000). Lava Lamp, a Novel Peripheral Golgi Protein, Is Required for Drosophila melanogaster Cellularization. *J Cell Biol* **151**, 905-918.
- Skeath, J. B. and Doe, C. Q.** (1996). The achaete scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the Drosophila CNS. *Curr Biol* **6**, 1146-52.
- Skeath, J. B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S. B. and Doe, C. Q.** (1995). Specification of neuroblast identity in the Drosophila embryonic central nervous system by gooseberry distal. *Nature* **376**, 427-30.
- Sliter, T. J., Henrich, V. C., Tucker, R. L. and Gilbert, L. I.** (1989). The genetics of the Dras3-Roughened-ecdysoneless chromosomal region (62B3-4 to 62D3-4) in Drosophila melanogaster: analysis of recessive lethal mutations. *Genetics* **123**, 327-36.
- Sniegowski, J. A., Lappe, J. W., Patel, H. N., Huffman, H. A. and Wachter, R. M.** (2005). Base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein. *J Biol Chem* **280**, 26248-55.
- So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R. and Berland, K. M.** (2000). Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu Rev Biomed Eng* **2**, 399-429.
- Sonnenfeld, M. J. and Jacobs, J. R.** (1995a). Apoptosis of the midline glia during Drosophila embryogenesis: a correlation with axon contact. *Development* **121**, 569-578.
- Sonnenfeld, M. J. and Jacobs, J. R.** (1995b). Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the Drosophila embryonic nervous system. *J Comp Neurol* **359**, 644-52.
- Soustelle, L., Besson, M. T., Rival, T. and Birman, S.** (2002). Terminal glial differentiation involves regulated expression of the excitatory amino acid transporters in the Drosophila embryonic CNS. *Dev Biol* **248**, 294-306.
- Stemerink, C. and Jacobs, J. R.** (1997). Argos and Spitz group genes function to regulate midline glial cell number in Drosophila embryos. *Development* **124**, 3787-96.
- Stollewerk, A. and Klämbt, C.** (1997). The midline glial cells are required for compartmentalisation of axon commissures in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development, Genes and Evolution* **207**, 401-409.
- Stork, T.** (2002). Charakterisierung des  $\alpha$ -Spectrin Lokus von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Münster
- Struhl, G. and Adachi, A.** (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-60.

- Szabad, J. and Bryant, P. J.** (1982). The mode of action of "discless" mutations in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **93**, 240-56.
- Takahashi, M., Takahashi, F., Ui-Tei, K., Kojima, T. and Saigo, K.** (2005). Requirements of genetic interactions between Src42A, armadillo and shotgun, a gene encoding E-cadherin, for normal development in *Drosophila*. *Development* **132**, 2547-59.
- Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J. and Tepass, U.** (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **151**, 891-904.
- Tanentzapf, G. and Tepass, U.** (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **5**, 46-52.
- Tatusova, T. A. and Madden, T. L.** (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* **174**, 247-50.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-85.
- Tepass, U.** (2002). Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* **24**, 690-5.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-37.
- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **161**, 563-96.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33.
- Thomas, G. H. and Kiehart, D. P.** (1994). Beta heavy-spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **120**, 2039-50.
- Thomas, G. H. and Williams, J. A.** (1999). Dynamic rearrangement of the spectrin membrane skeleton during the generation of epithelial polarity in *Drosophila*. *J Cell Sci* **112**, 2843-52.
- Thomas, G. H., Zarnescu, D. C., Juedes, A. E., Bales, M. A., Londergan, A., Korte, C. C. and Kiehart, D. P.** (1998). *Drosophila* betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye. *Development* **125**, 2125-34.
- Thomas, J. B., Crews, S. T. and Goodman, C. S.** (1988). Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* **52**, 133-141.
- Thummel, C. S. and Pirrota, V.** (1992). New CaSpeR P Element Vectors. *Drosophila Information Service* **71**.
- Tsacopoulos, M. and Magistretti, P. J.** (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* **16**, 877-85.
- Tsien, R. Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.
- Tsruya, R., Schlesinger, A., Reich, A., Gabay, L., Sapir, A. and Shilo, B. Z.** (2002). Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev* **16**, 222-34.
- Udolph, G., Rath, P. and Chia, W.** (2001). A requirement for Notch in the genesis of a subset of glial cells in the *Drosophila* embryonic central nervous system which arise through asymmetric divisions. *Development* **128**, 1457-66.

- Van Roessel, P., Hayward, N. M., Barros, C. S. and Brand, A. H.** (2002). Two-color GFP imaging demonstrates cell-autonomy of GAL4-driven RNA interference in *Drosophila*. *Genesis* **34**, 170-3.
- Vassin, H., Vielmetter, J. and Campos-Ortega, J. A.** (1985). Genetic interactions in early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* **2**, 291-308.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. and Giangrande, A.** (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**, 131-9.
- Wang, M., Champion, L. E., Biessmann, H. and Mason, J. M.** (1994). Mapping a mutator, mu2, which increases the frequency of terminal deletions in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **245**, 598-607.
- Wang, W. and Struhl, G.** (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**, 2883-94.
- Ward, R. E. t., Lamb, R. S. and Fehon, R. G.** (1998). A conserved functional domain of *Drosophila* coracle is required for localization at the septate junction and has membrane-organizing activity. *J Cell Biol* **140**, 1463-73.
- Watts, R. J., Hoopfer, E. D. and Luo, L.** (2003). Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron* **38**, 871-85.
- Weigmann, K., Cohen, S. M. and Lehner, C. F.** (1997). Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* **124**, 3555-63.
- White, K., Lisi, S., Kurada, P., Franc, N. and Bangs, P.** (2001). Methods for studying apoptosis and phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* tissues and cell lines. *Methods Cell Biol* **66**, 321-38.
- Wickramasinghe, S. N.** (1997). Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol* **98**, 785-97.
- Wickramasinghe, S. N.** (1998). Congenital dyserythropoietic anaemias: clinical features, haematological morphology and new biochemical data. *Blood Rev* **12**, 178-200.
- Wickramasinghe, S. N.** (2000). Congenital dyserythropoietic anemias. *Curr Opin Hematol* **7**, 71-8.
- Wickramasinghe, S. N. and Pippard, M. J.** (1986). Studies of erythroblast function in congenital dyserythropoietic anaemia, type I: evidence of impaired DNA, RNA, and protein synthesis and unbalanced globin chain synthesis in ultrastructurally abnormal cells. *J Clin Pathol* **39**, 881-90.
- Wilder, E. L. and Perrimon, N.** (1995). Dual functions of wingless in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* **121**, 477-88.
- Williams, J. A., MacIver, B., Klipfell, E. A. and Thomas, G. H.** (2004). The C-terminal domain of *Drosophila* (beta) heavy-spectrin exhibits autonomous membrane association and modulates membrane area. *J Cell Sci* **117**, 771-82.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E.** (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.
- Wolf, C., Gerlach, N. and Schuh, R.** (2002). *Drosophila* tracheal system formation involves FGF-dependent cell extensions contacting bridge-cells. *EMBO Rep* **3**, 563-8.

- Wolff, T. and Ready, D. F.** (1993). Pattern Formation in the *Drosophila* Retina. In *The Development of Drosophila melanogaster* Bate, Martinez Arias, (ed.: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Woods, C. M. and Lazarides, E.** (1985). Degradation of unassembled alpha- and beta-spectrin by distinct intracellular pathways: regulation of spectrin topogenesis by beta-spectrin degradation. *Cell* **40**, 959-69.
- Woods, D. F. and Bryant, P. J.** (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-64.
- Woods, D. F., Wu, J. W. and Bryant, P. J.** (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Dev Genet* **20**, 111-8.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yang, D., Lu, H. and Erickson, J. W.** (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* **10**, 1191-200.
- Yap, A. S., Briehner, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 119-46.
- Yeaman, C., Grindstaff, K. K. and Nelson, W. J.** (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* **79**, 73-98.
- Younossi-Hartenstein, A., Salvaterra, P. M. and Hartenstein, V.** (2003). Early development of the *Drosophila* brain: IV. Larval neuropile compartments defined by glial septa. *J Comp Neurol* **455**, 435-50.
- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W. C., Hiromi, Y. and Okano, H.** (2003). *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* **130**, 2419-28.
- Zaffran, S., Chartier, A., Gallant, P., Astier, M., Arquier, N., Doherty, D., Gratecos, D. and Semeriva, M.** (1998). A *Drosophila* RNA helicase gene, pitchoune, is required for cell growth and proliferation and is a potential target of d-Myc. *Development* **125**, 3571-84.
- Zarnescu, D. C. and Thomas, G. H.** (1999). Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* **146**, 1075-86.
- Zhou, L., Hashimi, H., Schwarz, L. M. and Nambu, J. R.** (1995). Programmed cell death in the *Drosophila* central nervous midline. *Curr. Biol.* **5**, 784-790.
- Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H. and Nambu, J. R.** (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5131-6.
- Zhou, L. and Steller, H.** (2003). Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in *Drosophila* embryos. *Dev Cell* **4**, 599-605.

Anhang

## **7. Anhang**

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AP	Alkalische Phosphatase
As	Aminosäuren
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
d	Tag
DAB	Diaminbenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
GS	Goat Serum
h	Stunde
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MetOH	Methanol
min	Minute
MNB	Medianer Neuroblast
MP1	Midline precursor 1, Mittellinienneuron
MP2	Midline precursor 2, Mittellinienneuron
MWP	Multiwell Platte
NBT	Nitro-blautetrazolinum-Chlorid
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PH	Pleckstrin-Homologiedomäne
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen/Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sek	Sekunde
ü.N.	über Nacht
UAS	Upstream activating sequence
UMI	Unpaired Median Interneuron, Mittellinienneuron
VUM	Ventral unpaired median, Mittellinienneuron
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2 Verwendete Oligonukleotide

### 7.2.1 Analyse von *Df(3L)kloP3*

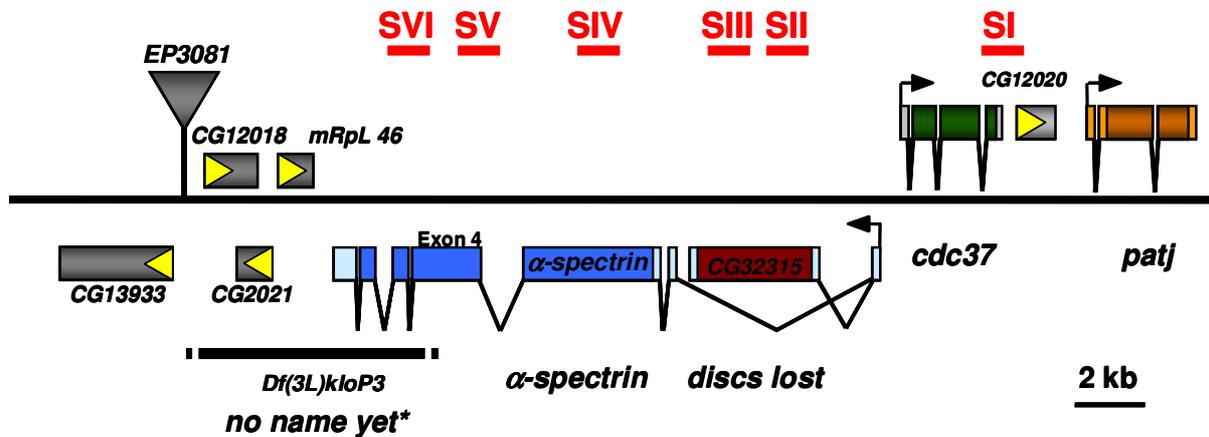


Abbildung A1: Sonden (SI-SVI) für die Southern Blot Analyse der *kloP3* Defizienz

### Primer für die Generierung von Sonden für die Southern Blot Analyse von *Df(3L)kloP3*

Primer	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
Sonde 1for	CCAGAAGCGTGCGCAGGAGAAGAT	$\alpha$ -spectrin Sonde I
Sonde 1rev	CATGTGGTCGCCGTCGTA CTGATAGG	
klo Seq 21for	CCACGTGATAGTATACATTC	$\alpha$ -spectrin Sonde II
klo Seq 3rev	CTGGTCAATACACCTATCC	
klo Seq 14f	GCAAAGAGCGGCATGAAGA	$\alpha$ -spectrin Sonde III
klo Seq 9rev	AAGCGAAAAGTGGGCGGT	
Sonde 4 for	GATGCGGCAATGGGTTCTTC	$\alpha$ -spectrin Sonde IV
Sonde 4 rev	ATTATGCCGCCGATGATGTGG	
Sonde 5for	CTCTTCGGTGGCCAGCTGCAACTTCTCT	$\alpha$ -spectrin Sonde V
Sonde 5rev	TTTCTGTGCCATCCTTTCATCATCGTCA	
Sonde 6for	GGCGACTGGGCGTGA CTGGCATTAT	$\alpha$ -spectrin Sonde VI
Sonde 6rev	GGCGTCCAGAACCTCAAGAAGAAGCACA	

## 7.2.2 Analyse von *patj*

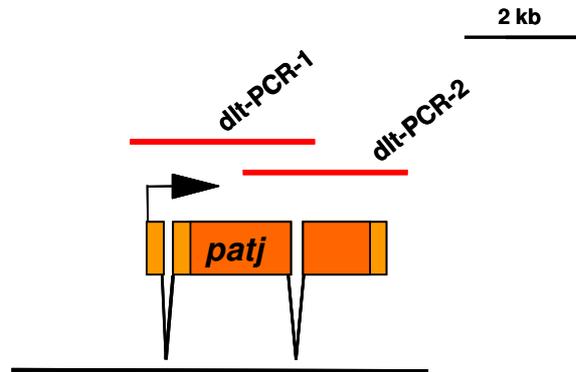


Abbildung All: Amplikons für die *patj* Sequenzierung.

### Oligonukleotide für die Sequenzierung des *patj* ORFs.

Amplifikationsprimer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
dlt-PCR-up1	CACAACGCCCCACCCAGAAGTCCATA
dlt-PCR-low1	CATTCACGCCAACGGGTCCATCAGGTAA
dlt-PCR-up2	CAACGGCCTGGGCATCACAAAT
dlt-PCR-low2	TGCTTCGGTAATAACAATCGCTCCTG
Sequenzierprimer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
dlt-f1	CCACGCTCCACTGACCGCAC
dlt-f2	GCAACCTTGTACTCAGTCTG
dlt-3f	GGACGGACGCTTGCGCTCG
dlt-f4	CCACCACGGAAGACGATCG
dlt-f5	CTCCAACCACCAGGCCGTAG
dlt-f6	CTCCTTTGGAGCGGGTAAGC
dlt-f7	TCGCGGTGCGAGGCTTGGG
dlt-f8	CTGCTGCCTGCTACCGATC
dlt-f9	GTGGCTCAATTGGACGGACG
dlt-f10	GTGGCTCAATTGGACGGACG
dlt-r1	CTGACATCGTTTTAGATTCTAC
dlt-r2	GCTCGCATTGCTGCAAGCC
dlt-r3	GACCAGCTCGATAATTTGC
dlt-r4	CACATCCAACGGCAGTTCC
dlt-r5	GTAATTGTGACGGGTGATC
dlt-r6	GTGGCGGAGGACGTTGTGGC
dlt-r7	GCTGAACCGGGCGACACGC
dlt-r8	GGCACCACAGCAGTGCCCG
dlt-r9	CAGCTCTATGGCCTGGATC
dlt-r10	CGAGTCCTGCACGTGGACG

### 7.2.3 Analyse von *discs lost*

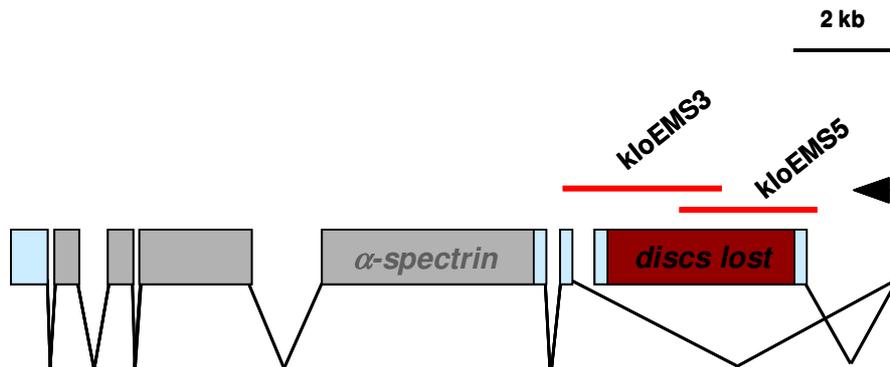


Abbildung All: Amplikons für die *discs lost* Sequenzierung.

#### Primer für die Sequenzierung des *discs lost* (CG32315) ORFs.

Amplifikationsprimer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
klo-EMS-3f	TGACCGTGCCCAACTGTAAAGA
klo-EMS-3r	TGGCCAATCACCCGTCAAAT
klo-EMS-5f	CCGCTAAAGGGCATCACAG
klo-EMS-5r	TTCTCATAATTTCCCGCCTAACTA
Sequenzierprimer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
klo-Seq-1rev	TCCGTTGCAGGGAAACAAA
klo-Seq-2rev	AGAGGTACTACTATTCGCAA
klo-Seq-3rev	CTGGTCAATACACCTATCC
klo-Seq-4rev	GGAAATCAAAGCGAAGCG
klo-Seq-5rev	GTTACTTCTGCAGCTTGAC
klo-Seq-6rev	GCCGCGTATTATGGATATC
klo-Seq-7rev	TTGATCTGCTCCAGCTAAC
klo-Seq-8rev	CAGTGGCCACTTTGGAGCT
klo-Seq-9rev	AAGCGAAAAGTGGGCGGT
klo-Seq-10rev	TGAGATCTTTCAAGATGCCA
klo-Seq-11rev	TCAAGCCGTCAAAGATTCC
klo-Seq-12rev	GGAATCTTTGACGGCTTGA
klo-Seq-13f	CGCTATCTTATCGGGTACA
klo-Seq-14f	GCAAAGAGCGGCATGAAGA
klo-Seq-15f	GACCGCCTTTTGGGCTTTT
klo-Seq-16f	TGAGCATATGTAGACCGCA
klo-Seq-17f	GTGGACGCGTTTTGGGATT
klo-Seq-18f	GCTTCCTGTGCCCTGTAAT
klo-Seq-19f	TGCAACTGCTGTGGACAAA
klo-Seq-20f	AGCGCTGTGCCAGCTTATT
klo-Seq-21f	CCACGTGATAGTATACATTC
klo-Seq-22f	ACCACAAAATAAGTTCACG
klo-Seq-23f	AGGAGCTGGCCGAAACATT
klo-Seq-24f	ACTTCCTGGCGTTGATCTT
klo-Seq-25f	CGCAGTGCACCTAAAAGT

## 7.2.4 Analyse von $\alpha$ -spectrin

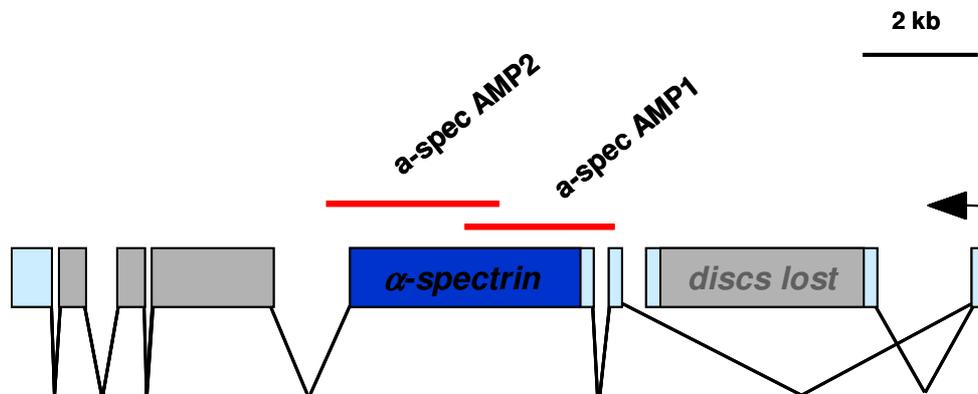


Abbildung AIV: Amplikons für die  $\alpha$ -spectrin Sequenzierung.

### Primer für die Sequenzierung des $\alpha$ -spectrin (CG32315) ORFs.

Amplifikationsprimer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
a-spec AMP 1 for	AATGTCCTCGATGGTGCGGTTGAA
a-spec AMP 1 rev	GATGAAGGGTTAGCAGCAGCAGCAGTAT
a-Spec AMP 2 rev	GATGAAGGGTTAGCAGCAGCAGCAGTAT
a-Spec AMP 2 for neu	GGGAGATGGTGGTAAGCGAAGGA
Sequenzierprimer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
a-Spec Seq 1 rev	AGCGACGTGAGCAGGTTC
a-Spec Seq 2rev	CCAGTGCGAGGAGGTGAT
a-Spec Seq 3rev	CTACTACCTGCACCGTTTCCTC
a-Spec Seq 4rev	CGACTCCCTGGACTCTGTG
a-Spec Seq 5 rev	CGCACCATCGAGGACATT
a-Spec Seq 6 rev	GCGGTCGTGACTTGATTGG
a-Spec Seq 7 rev	AAGGAGTGCGTGGTTGC
a-Spec Seq 8 rev	CTGAAGGCCAACGAAGTGC
a-Spec Seq 9 rev	TGCAGCGTTTCCTCAGC
a-Spec Seq 1f	CTGTCATCGGTGGCAAAC
a-Spec Seq 2f	GGCCATCCAAGTGCAGC
a-Spec Seq 3f	CGAGCCTTGGTGGTGAG
a-Spec Seq 4f	CTTGCGCTTGGTAATAGTGTC
a-Spec Seq 5f	CCTCGAACGCCTGATGT
a-Spec Seq 6 for	ATGATGGGGATTTGGATGT
a-Spec Seq 7 for	CTTCTGCTTGGCGTAGGTC
a-Spec Seq 8 for	CAGGTCGTCGTTGAAGTCG
a-Spec Seq 9for	GGTGTGGCCAAAAGCCTCTA
a-Spec Seq 10 for	GCATAGCGAGCCGACAG

## Lebenslauf

Name: Wilm Tobias Stork  
Geboren: am 03.05.1977 in Bünde  
Eltern: Dieter Stork  
Ingrid Stork, geb. Bartelheimer

Gymnasium: 08/1983-07/1987 Grundschule Dünne  
08/1987-10/1990 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Bünde  
10/1990-06/1996 Martinum Emsdetten  
06/1996 Hochschulreife (Abitur)

Studium: 10/1996 –01/2002 Diplomstudiengang Biologie an der  
Westfälischen Wilhelms- Universität Münster  
  
01/2002 Diplom im Fach Biologie im Institut für  
Neurobiologie der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster bei Prof. Dr. Klämbt  
  
ab 03/2002- Promotionsstudiengang an der Westfälischen  
Wilhelms- Universität Münster im Fachbereich  
Biologie

Tätigkeiten: ab 03/2002 Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter  
im Institut für Neurobiologie der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dissertation: ab 03/2002 Im Institut für Neurobiologie der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster bei Prof. Dr. Klämbt

Münster, den.....

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Münster, den .....

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Christian Klämbt angefertigt. Christian danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor zu erstellen, für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die tolle Atmosphäre im Labor.

Herrn Prof. Dr. W. Janning möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Organisation der Treffen in Rothenberge danken.

Vielen, vielen Dank an alle im Labor. In erster Linie möchte ich mich bei Ingrid, Karin, Alex und Alex, Monika, Elke, Steffi, Anne und Susanne bedanken, ohne die die Arbeit im Labor nicht denkbar wäre. Auch Uwe möchte ich für die Hilfe bei allen organisatorischen Dingen, in genetischen Fragen und bei der Durchführung der Mutagenese danken.

Vielen Dank an meine Promotionsmitstreiter Jörn und Mareike ohne die ich sicher noch ein paar graue Haare mehr hätte.

Ein Dankeschön an die Ehemaligen Jan, Gundi, Jens und Dirk für viel Spaß, die hervorragende Betreuung und diverse Erfolge bei der Fantasy Tour.

Weiterhin Dank an alle aktuellen Münsteraner wie Liane, Marion, Raiko, Nils, Christoph, Daniel und die anderen für die tolle Zusammenarbeit im Labor, beim Grillen, Tanzen und Feiern.

Danke auch an meine Familie und Freunde.